

**Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen**

Institut für Pharmakologie

**Charakterisierung der molekularen Mechanismen
der Aktivierung des
Ras-spezifischen Austauschfaktors RasGRP3 durch
den EGF-Rezeptor**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

**zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen**

**vorgelegt von
Daniel Christian Szatkowski
aus Bochum
2006**

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. K.-H. Jöckel
1. Gutachter:	Priv.-Doz. Dr. M. Schmidt
2. Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. E. Gulbins

Tag der mündlichen Prüfung:	14. November 2006
-----------------------------	-------------------

Während der Promotion entstandene Publikationen

Originalarbeiten

Stope, M.B., vom Dorp, F., Szatkowski, D., Böhm, A., Keiper, M., Nolte, J., Oude Weernink, P.A., Roszkopf, D., Evellin, S., Jakobs, K.H. & Schmidt, M. (2004): Rap2B-dependent stimulation of phospholipase C- ϵ by epidermal growth factor receptor mediated by c-Src phosphorylation of RasGRP3. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4664-4676.

Keiper, M., Stope, M.B., Szatkowski, D., Böhm, A., Tysack, K., vom Dorp, F., Saur, O., Oude Weernink, P.A., Evellin, S., Jakobs, K.H. & Schmidt, M. (2004): Epac- and Ca^{2+} -controlled activation of Ras and extracellular signal-regulated kinases by G_s -coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 279, 46497-46508.

Abstracts von Poster- und Vortragspräsentationen auf nationalen Tagungen

Schmidt, M., Keiper, M., Böhm, A., Evellin, S., Sari, A., Szatkowski, D., vom Dorp, F., Oude Weernink, P.A. & Jakobs, K.H. (2003): Mechanisms of the CalDAG3- and Rap2B-mediated phospholipase C stimulation by the epidermal growth factor receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 367, R195.

Szatkowski, D., Böhm, A. & Schmidt, M. (18.07.2003): Molekulare Mechanismen der CalDAG3- und Rap2B-abhängigen Phospholipase C- ϵ -Stimulation durch EGF. *Posterpräsentation am 2. Forschungstag des Universitätsklinikums Essen.*

Szatkowski, D., Keiper, M., Stope, M.B., Oude Weernink, P.A., Jakobs, K.H. & Schmidt, M. (2004): PLC- ϵ and CalDAG2-mediated activation of Ras and MAP kinases by the β_2 -Adrenoceptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 369, R203.

Schmidt, M., Stope, M.B., Szatkowski, D., vom Dorp, F., Oude Weernink, P.A. & Jakobs, K.H. (2004): Epac and Ca^{2+} -controlled activation of Ras and extracellular signal-regulated kinases by G_s -coupled receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 371, R10.

Inhaltsverzeichnis..... I

1.	Einleitung.....	7
1.1	Tyrosinkinasen.....	7
1.2	Phospholipase C.....	10
1.3	Monomere GTPasen.....	13
1.4	Guaninnukleotid-Austauschfaktoren.....	15
1.4.1	Ca ²⁺ /DAG-regulierte Austauschfaktoren.....	16
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	18
2.	Materialien und Methoden.....	19
2.1	Materialien.....	19
2.1.1	(Bio-)Chemikalien.....	19
2.1.2	Radioaktive Chemikalien.....	22
2.1.3	Antikörper, Enzyme und Toxine.....	22
2.1.4	Plasmide.....	23
2.1.5	Expressionsvektor-Systeme.....	24
2.1.6	Bakterien.....	24
2.1.7	Zelllinien.....	24
2.1.8	Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	24
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Zellkultivierung.....	26
2.2.1.1	Kultivierung von HEK-293-Zellen.....	26
2.2.1.2	Kultivierung von Sf9-Zellen.....	27
2.2.2	Präparation und Transformation kompetenter Bakterien.....	28
2.2.2.1	Präparation kompetenter Bakterienzellen.....	28
2.2.2.2	Transformation kompetenter Bakterienzellen.....	28
2.2.2.3	Präparation von Plasmid-DNA.....	29
2.2.3	Nachweis von RasGRP (1-3) mittels Reverser Transkription- Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	30
2.2.3.1	Restriktionsverdau und Reverse Transkription.....	30
2.2.3.2	Polymerasekettenreaktion und DNA-Agarosegel-Elektrophorese..	31
2.2.4	Transfizierung von Zellen.....	32

2.2.4.1	Transfizierung von HEK-293-Zellen.....	32
2.2.5	Bestimmung von IP ₃	33
2.2.6	Bestimmung der intrazellulären Ca ²⁺ -Konzentration.....	35
2.2.7	Bestimmung der Rap-Aktivierung.....	35
2.2.7.1	Herstellung von GST-RaIGDS-RBD aus <i>E. coli</i>	35
2.2.7.2	<i>Pull-down Assay</i>	37
2.2.8	Immunpräzipitation und Phosphorylierungs-Assay.....	39
2.2.8.1	Immunpräzipitation.....	39
2.2.8.2	<i>In vitro</i> -Phosphorylierung durch c-Src.....	40
2.2.9	Reinigung von GST- <i>getaggt</i> em RasGRP3 aus Sf9-Zellen.....	41
2.2.9.1	Herstellung des GST- <i>getaggt</i> en RasGRP3.....	41
2.2.9.2	Restriktionsverdau.....	42
2.2.9.3	DNA-Agarosegel-Elektrophorese, - Gelextraktion, - Ligation.....	43
2.2.9.4	Kultivierung und Selektion positiver Klone.....	44
2.2.9.5	Minipräparation von Plasmid-DNA.....	44
2.2.9.6	Rekombination von Transfervektor-DNA/BaculoGold-Virus-DNA..	45
2.2.9.7	Virusernte.....	46
2.2.9.8	Passagierung (Infektionen und Virusernten).....	46
2.2.9.9	Plaquereinigung.....	47
2.2.9.10	PEG-Fällung von Virionen.....	48
2.2.9.11	Virustitration.....	49
2.2.9.12	Affinitätsreinigung von GST- <i>getaggt</i> en Fusionsproteinen.....	50
2.2.10	Proteinbestimmungen.....	52
2.2.10.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	52
2.2.10.2	BCA-Proteinbestimmung.....	53
2.2.11	SDS-PAGE, Immunoblot, Immunfluoreszenzmikroskopie.....	53
2.2.11.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	53
2.2.11.2	Immunoblot.....	55
2.2.11.3	Konfokale Immunfluoreszenz-Lasermikroskopie.....	56
2.2.12	Datenauswertung.....	57
3.	Ergebnisse.....	58
3.1	PLC- ϵ -Stimulation nach Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.....	58

3.2	Einfluss der PLC-Isoformen γ_1 und ϵ auf die PLC-Aktivierung nach EGF-Rezeptor-Stimulation.....	59
3.3	Rap2B-Beteiligung an der EGF-Rezeptor-vermittelten Stimulation und Translokation der PLC- ϵ	61
3.4	RasGRP3-Beteiligung an der Rap2B- und PLC-Aktivierung nach EGF-Rezeptor-Stimulation.....	64
3.5	Mechanismen der RasGRP3-vermittelten PLC- ϵ -Aktivierung nach EGF-Rezeptor-Stimulation.....	68
4.	Diskussion.....	82
5.	Zusammenfassung.....	92
6.	Literaturverzeichnis	93
7.	Anhang.....	101
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	101
7.2	Danksagung.....	105
7.3	Lebenslauf.....	106

1. Einleitung

Zahlreiche Erkrankungen des Menschen sind mit Störungen zellulärer Regulationsprozesse sowie der zellulären Signalverarbeitung assoziiert. Daher kommt der inter- und intrazellulären Signalverarbeitung eine große medizinische Bedeutung zu (Karin, 1992). Für die zelluläre Registrierung von Signalen werden in der Regel als Rezeptoren bezeichnete, spezialisierte Proteine verwendet, bei denen beim Signalempfang durch Bindung spezifischer Liganden der Prozess der Signalverarbeitung, d.h. der Signaltransduktion, initiiert wird. Bei Signalwegen, bei denen ein ankommendes Signal von membranständigen Rezeptoren an der Zellmembran empfangen wird, ist eine Diffusion des Signalmoleküls in die Zielzelle nicht erforderlich. Dagegen ist diese Diffusion zur Aktivierung von im Zytosol oder im Zellkern lokalisierten Rezeptoren (Guanylylcyclasen, Steroidhormonrezeptoren) notwendig. Die membranständigen Rezeptoren (Transmembranrezeptoren) können in heptahelikale, an heterotrimere G-Proteine koppelnde Rezeptoren, Ionenkanalrezeptoren und Enzym-assoziierte Rezeptoren unterteilt werden. Zu der letztgenannten Gruppe zählen die Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität wie der Rezeptor für den Wachstumsfaktor *Epidermal growth factor* (EGF), der das Produkt des c-erbB-Protoonkogens ist, oder die Rezeptoren mit assoziierten Tyrosinkinasen wie verschiedene Zytokinrezeptoren (Erythropoietin-, Interferon-, Interleukin-, Tumornekrosefaktor- und Wachstumshormonrezeptoren), Oberflächenrezeptoren (insbesondere Integrin-Rezeptoren) und Antigenrezeptoren der B- und T-Lymphozyten (Krauss, 2003).

1.1 Tyrosinkinasen

Die Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität besitzen auf der Oberfläche der Zellmembran spezifische Bindungsstellen für extrazelluläre Liganden. Bindung des Liganden an den Rezeptor aktiviert eine auf der zytoplasmatischen Domäne lokalisierte Tyrosin-spezifische Proteinkinaseaktivität des Rezeptors. Als Folge werden Tyrosin-Phosphorylierungen am Rezeptor selbst (u. a. an den Tyrosinresten 992, 1068, 1148, 1173 und 1186 im C-terminalen Abschnitt) sowie an Substratproteinen eingeleitet, die über eine Kette weiterer nachgeschalteter Reaktionen die biologische Antwort der Zelle wie Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben auslösen (Fantl *et al.*, 1993; Schlessinger, 2000). Im ersten Fall liegt eine Autophosphorylierung vor, im zweiten Fall wird das Signal an spezifische Effektorproteine weitergegeben. Die Effektorproteine können selbst enzymatische Aktivität tragen und durch die Tyrosinphosphorylierung

aktiviert werden. Sie können aber auch als Adaptormoleküle wirken, denen die Aufgabe zukommt, das Signal an weitere Komponenten des Signalwegs weiterzuleiten. Mit Hilfe der Adaptormoleküle werden andere Signalproteine zum aktivierten Rezeptor und zur Zellmembran hingeführt und in die Signalübertragung mit einbezogen. Zu den Effektorproteinen, deren Aktivierung durch Tyrosin-Phosphorylierung reguliert wird, gehören u. a. Phospholipase C (PLC)- γ -Isoformen (siehe unten), die an den Aminosäureresten 472, 771, 783 und 1254 phosphoryliert werden können (Kim *et al.*, 1991), sowie die zytoplasmatischen Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen der Src-Familie (Parsons & Parsons, 1997). Andere an der Signalübertragung von Tyrosinkinase-Rezeptoren beteiligte Effektorproteine sind Guaninnukleotid-Austauschfaktoren der Ras-Superfamilie monomerer GTPasen (Hall, 2000; Takai *et al.*, 2001; Quilliam *et al.*, 2002). Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten HEK-293-Zellen exprimieren endogen PLC-Isoformen, c-Src und verschiedene Ras-spezifische Austauschfaktoren (Stope *et al.*, 2004).

Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen übernehmen Funktionen in der Signaltransduktion *via* Zytokinrezeptoren, B- und T-Zellrezeptoren. Charakteristisch für die zytoplasmatischen Tyrosinkinasen ist ihre permanente und/oder transiente Assoziation mit subzellulären Strukturen und ihre variable subzelluläre Verteilung. Die zytoplasmatischen Tyrosinkinasen sind intrazelluläre Effektormoleküle, die im Zuge der Signalübertragung mit spezifischen Substraten assoziieren können und diese im Sinne einer Weitergabe des Signals durch eine Tyrosinphosphorylierung aktivieren. Viele der Funktionen der zytoplasmatischen Tyrosinkinasen werden in unmittelbarer Nachbarschaft zur Zellmembran ausgeführt, sei es, dass ein Signal von einem aktivierten membranständigen Rezeptor empfangen wird, oder dass ein Signal an ein membranassoziiertes Protein weitergegeben wird. Um die Membranassoziation zu erleichtern, enthalten viele Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen N-terminale Lipidanker (Hubbard & Till, 2000). Die zytoplasmatischen Tyrosinkinasen lassen sich aufgrund von Sequenzhomologien in verschiedene Familien einteilen, von denen die Src-Familie am besten charakterisiert ist. Src ist an der Regulation der Zellteilung, -differenzierung und -aggregation beteiligt. Wenigstens 9 unterschiedliche Proteine gehören zur Src-Familie (Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Blk, Hck, Fgr, Yrk), die eine Größe von 53 bis 64 kDa haben (Taniguchi, 1995). Neben der katalytischen Domäne tragen die zytoplasmatischen Tyrosinkinasen oft noch *Src homology* (SH)-Domänen (SH2- und SH3-Domänen), die durch Erkennung Phosphotyrosin-/Prolin-reicher Sequenzen an Tyrosinkinase-Rezeptoren und Proteine des Zytoskeletts binden und somit spezifische Protein-Protein-Assoziationen vermitteln (Hubbard & Till, 2000). Zytoplasmatische Tyrosinkinasen, die

sowohl SH2- als auch SH3-Domänen enthalten, können bei der Signalübertragung in größere Proteinkomplexe eingebunden werden (Taniguchi, 1995).

Die Tyrosinkinase Src ist ein Enzym, das einen Myristinsäurerest als Membrananker trägt und durch die N-terminalen SH2- und SH3-Domänen sowie über Phosphorylierung in komplexer Weise engmaschig reguliert wird. Die Src-Kinase besitzt zwei wichtige regulatorische Phosphorylierungsstellen, nämlich Tyrosin (Tyr) 416 in der Aktivierungsschleife und Tyrosin 527 in der Nähe des C-Terminus. Zahlreiche Mutationsstudien haben gezeigt, dass die SH2- und SH3-Domänen genauso wie die Phosphorylierung von Tyr 527 an der negativen Kontrolle der Src-Kinase-Aktivierung involviert sind. Mutationen in den SH2- und SH3-Domänen, die die Bindung an Phosphotyrosin (P-Tyr) und insbesondere Prolin-reiche Sequenzen blockieren, stimulieren die Src-Aktivität. Ähnlich führt die Substitution von Tyr 527 durch Phenylalanin zur Src-Aktivierung. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde ein Modell entwickelt, nach dem die Src-Kinase durch intramolekulare Interaktionen, die die SH2- und SH3-Domäne und Phosphotyrosin 527 einbeziehen, in einem inaktiven Zustand gehalten wird (Hubbard & Till, 2000). Nach diesem Modell können aktive Formen der Src-Kinase via Phosphorylierung an Tyr 527 inaktiviert werden, während die intramolekulare Bindung von P-Tyr 527 an die SH2-Domäne das Enzym in dem inaktiven, autoinhibierten Zustand fixiert. Die repressive Phosphorylierung an Tyr 527 wird z. B. durch die c-Src-spezifische Proteinkinase namens Csk katalysiert. Die Aktivierung kann über mehrere Wege erfolgen. So hebt die Dephosphorylierung von P-Tyr 527 durch Tyrosinphosphatasen die Autoinhibition auf, genauso wie die Bindung der SH2-Domäne an hochaffine Phosphotyrosinreste, die in anderen Signalproteinen lokalisiert sind, eine Aktivierung bedingt. Über den gleichen Weg unterbricht die Bindung von P-Tyr 527 an hochaffine SH2-Domänen von anderen Signalproteinen die autoinhibitorische intramolekulare Interaktion. Die Bedeutung der Phosphorylierung an Tyr 527 wird durch die v-Src-Kinase hervorgehoben, einer onkogenen Variante der Src-Kinase. Diese ist ein Produkt des *Rous Sarcoma Virus*, wurde bei der Suche nach dem Tumor verursachenden Prinzip der Retroviren entdeckt und war die erste identifizierte Tyrosinkinase. Im Zusammenhang mit der C-terminalen Verkürzung fehlt der v-Src-Kinase als inhibitorisches Element die regulatorische Tyr 527-Stelle und sie ist ein konstitutiv-aktives, potentes transformierendes Protein, das zu einem unkontrollierten Wachstum von infizierten Zellen führen kann. Eine definitive Zuordnung der Src-Kinase zu einem bestimmten Signalweg hat sich als schwierig erwiesen, da sie in mehrere Signalwege eingebunden ist. So sind funktionelle Interaktionen mit den Phosphotyrosinresten der Wachstumsfaktor-Rezeptoren für den *Platelet-derived growth factor* (PDGF) und EGF, mit der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) und mit Gerüstproteinen aus dem N-Methyl-D-Aspartat-Komplex beschrieben

worden (Parsons & Parsons, 1997). Außerdem können die aktivierten Untereinheiten $G\alpha_s$ und $G\alpha_i$ im Gegensatz zu $G\alpha_q$, $G\alpha_{12}$ und $G\beta\gamma$ direkt und spezifisch c-Src binden, die Enzymaktivität aktivieren, die Funktion dieses Enzyms auch im phosphorylierten Zustand triggern (Ma *et al.*, 2000) und die Autophosphorylierung von Tyr 416 erhöhen.

1.2 Phospholipase C

Phospholipasen sind Enzyme, die Phospholipide insbesondere der Plasmamembran spalten. Anhand der Spezifität des Angriffspunkts am Phospholipid werden Phospholipasen des Typs A1, A2, C und D unterschieden. Von großer Bedeutung ist die Hydrolyse von Inositol-haltigen Phospholipiden durch die in jeder eukaryonten Zelle vorkommende Phospholipase C (PLC). Diese katalysiert die Freisetzung von Diacylglycerol (DAG) und Inosit-1,4,5-trisphosphat (IP_3) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), einem in Membranen in geringen Mengen vorkommenden Phospholipid. DAG kann verschiedene Proteinkinase C (PKC)-Isoformen aktivieren und diese Isoformen sind an vielen zellulären Prozessen wie Permeabilität, Kontraktion, Migration, Hypertrophie, Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Sekretion beteiligt (Dempsey *et al.*, 2000). Der andere von der PLC freigesetzte *second messenger* IP_3 bindet an Rezeptoren des endo/sarkoplasmatischen Retikulums und moduliert durch die nachfolgende Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration Ca^{2+} -abhängige Prozesse (Berridge *et al.*, 2000). Die PLC-Isoformen sind über diese Mechanismen an bedeutenden zellulären Vorgängen wie Fertilisation, Proliferation, Kontraktion z. B. glatter Muskelzellen, Sekretion sowie an Lern- und Gedächtnisprozessen in Neuronen beteiligt und haben eine Schlüsselrolle bei verschiedenen frühen und späten Zellantworten auf die Aktivierung unterschiedlicher Membranrezeptoren.

Das charakteristische Kennzeichen aller Enzyme der PLC-Familie ist ein katalytisches Zentrum (Abb. 1), das aus den beiden hochkonservativen X- und Y-Domänen besteht (Rhee, 2001; Schmidt *et al.*, 2004). So katalysiert die X-Domäne der PLC- δ_1 die Hydrolyse der Phosphoinositide, während die Y-Domäne für die Substrat-Bindung verantwortlich ist (Cheng *et al.*, 1995). Daneben besitzen sie zwei EF- bzw. Helix-Loop-Helix-Strukturen, die Ca^{2+} -Ionen binden (Ikura, 1996) und eine C2-Domäne, die mit Phospholipiden in einer Ca^{2+} -abhängigen Art und Weise interagiert und in die Translokation an Membranen nach Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration verwickelt ist (Newton, 2001). Mit Ausnahme der erst vor wenigen Jahren identifizierten PLC- ξ besitzen alle anderen PLC-Isoformen eine N-terminal gelegene Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne. PH-Domänen sind kleine, aus 100 bis 120 Aminosäuren bestehende

Proteinmodule und kommen in mehr als 100 verschiedenen Proteinen vor, die an der intrazellulären Signalübertragung beteiligt sind. Diese Strukturmodule binden PI(4,5)P₂ und PI(1,4,5)P₃, manche von ihnen können zusätzlich mit den Phosphoinositid-Derivaten PI(3)P und PI(3,4)P₂, mit dem von der PLC freigesetzten IP₃, mit βγ-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine und mit GTP-gebundenem Rac Bindungen eingehen (Kavran *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999; Snyder *et al.*, 2003). Vermutlich liegt in der unterschiedlichen Struktur der PLC-Isozyme die Ursache für die differenzielle Regulation durch verschiedene Membranrezeptoren.

Struktur der PLC-ε

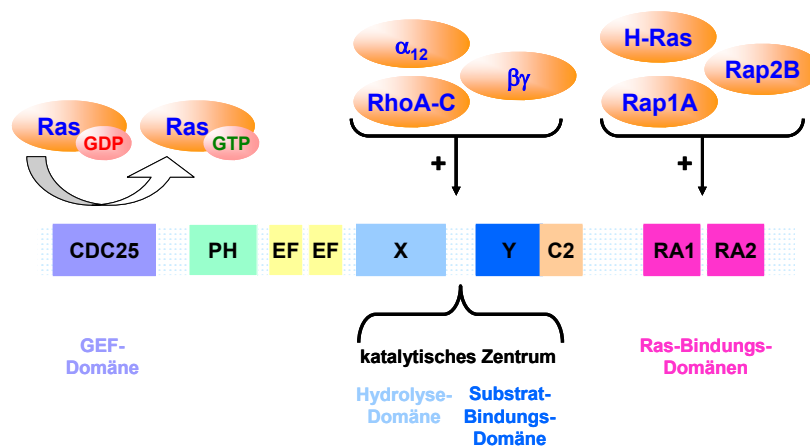


Abbildung 1. Domänenstruktur der PLC-ε und deren Interaktionsmöglichkeiten mit verschiedenen Signalproteinen. PH, *Pleckstrin homology domain*, RA, *Rap/Ras-associating domain*, GEF, *guanine nucleotide exchange factor*. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

Gegenwärtig sind 13 PLC-Isoformen identifiziert worden, die in 6 Subfamilien (PLC-β₁₋₄, PLC-γ₁₋₂, PLC-δ₁₋₄, PLC-ε, PLC-ξ und PLC-η) eingeteilt werden (Rhee, 2001; Schmidt *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2005; Harden & Sondek, 2006). PLC-β-Isoformen (MG: 130-155 kDa) besitzen einen charakteristischen langen, regulatorisch wirkenden C-Terminus (außer einer Spleißvariante der PLC-β₄), der nach Dimerisierung anscheinend für die Aktivierung durch GTP-gebundene α-Untereinheiten von G_q-Proteinen verantwortlich ist (Ilkaeva *et al.*, 2002). Dieser C-Terminus besitzt auch eine GTPase-aktivierendes Protein (GAP)-Aktivität und ahmt damit die Gα_q-Interaktionsstelle der Regulator der G-Protein-Signalübertragung (RGS)-Proteine nach, die eine Familie der GAP-Proteine für heterotrimere G-Proteine sind (Ross & Wilkie, 2000; Ilkaeva *et al.*, 2002). Weiter triggert der C-Terminus auch die Membran-Assoziation und die (Trans-) Lokalisation der PLC-β₁ in den Zellkern (Kim *et al.*, 1996). Zusätzlich enthalten PLC-β-Enzyme ein C-terminales

Bindungsmotif, X(Ser/Thr)–X(Val/Leu), von dem bekannt ist, dass es mit PDZ-Domänen enthaltenden Proteinen interagiert, so dass es ein Gerüst für Signalproteine fördert (Suh *et al.*, 2001). Die $\beta\gamma$ -Untereinheiten von Rezeptoren der G_q -Familie (insbesondere des G_i -Typs) können die vier Mitglieder der PLC- β -Subfamilie ebenfalls stimulieren (Kim *et al.*, 1996; Ilkaeva *et al.*, 2002).

Die PLC- γ -Isoformen (MG: ca. 145 kDa) tragen eine zusätzliche PH-Domäne, welche durch zwei SH2-Domänen aufgeteilt ist, und eine SH3-Domäne. Die SH2-Domänen vermitteln die Bindung an Phospho-Tyrosinreste der aktivierten autophosphorylierten Tyrosinkinasedomänen des EGF- oder PDGF-Rezeptors und die folgende Tyrosinphosphorylierung (Rebecchi & Pentyala, 2000; Rhee, 2001; Fukami, 2002; Schmidt *et al.*, 2004). Dagegen ist von der SH3-Domäne bekannt, dass sie die Bindung an Prolin-reiche Sequenzen vermittelt. Vor kurzer Zeit ist gezeigt worden, dass die Abschnitte der PH-Domäne der PLC- γ_1 mit dem Elongationsfaktor-1 α (EF-1 α), einem Aktivator der PI-(4)-Kinasen, interagieren (Chang *et al.*, 2002) und dass die SH3-Domäne der PLC- γ_1 eine Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF)-Aktivität für die nukleäre GTPase PIKE zeigt, von der bekannt ist, dass sie nukleäre PI-(3)-Kinasen aktiviert (Ye *et al.*, 2002). Beide Mechanismen können an einem schnellen, hoch-dynamischen Phosphoinositid-Umsatz in intakten Zellen teilhaben. Interessanterweise interagiert die SH3-Domäne der PLC- γ_1 auch mit den Phox-Homologie-Domänen der PLD₂ und könnte deshalb die beiden an der Signalübertragung beteiligten Phospholipase-Familien direkt verknüpfen (Jang *et al.*, 2003).

Über die Aktivierung der PLC- δ -Enzyme (MG: ca. 85 kDa) durch Membranrezeptoren ist bisher nur wenig bekannt, sie werden anscheinend durch den kapazitativen Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum aktiviert (Kim *et al.*, 1999) oder durch GTP aktiviert, das die PLC- δ_1 -Aktivität durch Freisetzung des Enzyms aus der inhibitorischen Assoziation mit G_i /Transglutaminase reguliert (Schmidt *et al.*, 2004).

Ebenso ist der genaue Aktivierungsmechanismus der PLC- ξ (MG: ca. 74 kDa) noch nicht bekannt. Dieses Enzym wurde im Sperma identifiziert, ist in der Lage, typische Ca^{2+} -Oszillationen in Eizellen zu induzieren, und soll als molekularer Auslöser an der embryonalen Entwicklung von der befruchteten Eizelle bis zum Embryo beteiligt sein (Saunders *et al.*, 2002).

Vor kurzer Zeit ist eine neue Isoform der PLC namens PLC- η entdeckt worden, die ein aktives, aus der X- und Y-Domäne bestehendes katalytisches Zentrum, eine PH-Domäne und eine C2-Domäne enthält und deren katalytische Aktivität von der $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration abhängig ist (Hwang *et al.*, 2005). Von den bisher beschriebenen drei Spleißvarianten (1002, 1035 und 1693 Aminosäuren) wird nur das 115 kDa-Protein in neuronalen Geweben mit hohem Zellanteil (z. B. zerebraler Kortex) exprimiert und spielt

dort vermutlich eine fundamentale Rolle für deren Funktion. Über die Regulation dieses Enzyms ist bisher kaum etwas bekannt.

Die vor einigen Jahren identifizierte PLC- ϵ (MG: 230-260 kDa) enthält (Abb. 1) eine N-terminale CDC25-Domäne, die GEF-Aktivität für Ras und Ras-ähnliche GTPasen (z. B. Rap1) besitzt, und zwei C-terminale *Ras associating* (RA)-Domänen, von denen die RA2-Domäne spezifisch mit GTP-gebundenen Ras-ähnlichen GTPasen interagiert (Jin *et al.*, 2001; Kelley *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2001). Koexpressionsstudien haben ergeben, dass die PLC- ϵ durch Proteine vom G α_{12} -Typ und durch G $\beta\gamma$ -Dimere (Lopez *et al.*, 2001; Wing *et al.*, 2001), durch Ras-ähnliche GTPasen wie H-Ras, Rap1A und Rap2B (Kelley *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2002) sowie durch Rho-GTPasen (besonders RhoA-C) aktiviert werden kann (Wing *et al.*, 2003). Diese Signalmoleküle können in der Signalkette der PLC- ϵ vorgeschaltet sein und somit die Aktivität der PLC- ϵ beeinflussen. Zumindest für Ras wurde eine GTP-Beladung, d. h. Aktivierung, durch die PLC- ϵ -spezifische GEF-Domäne nachgewiesen (Lopez *et al.*, 2001). Dies kann somit bedeuten, dass Ras-Proteine *up-* und/oder *downstream* der PLC- ϵ lokalisiert vorliegen können. Von den genannten Signalmolekülen ist kein Protein in der Lage, allein die Aktivität der PLC- ϵ *in vitro* direkt zu stimulieren. Diese Tatsache weist darauf hin, dass zur Aktivierung der PLC- ϵ ein hoch organisierter Signalkomplex notwendig ist. In der Tat wurde gezeigt, dass die Aktivierung ektopisch exprimierter PLC- ϵ durch den EGF-Rezeptor von einer H-Ras und Rap1A-abhängigen subzellulären Umverteilung begleitet ist (Jin *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2001; Kelley *et al.*, 2004). Außerdem wird ektopisch exprimierte PLC- ϵ durch eine PDGF-Rezeptor-Mutante aktiviert, die die PLC- γ_1 nicht aktivieren kann. Die Aktivierung der PLC- ϵ durch diese PDGF-Rezeptor-Mutante wird durch H-Ras und Rap1A-vermittelt (Song *et al.*, 2002).

1.3 Monomere GTPasen

Monomere GTPasen sind wichtige intrazelluläre Informationsüberträger, die nur aus einer einzigen Polypeptidkette bestehen. Sie existieren in zwei verschiedenen Aktivitätszuständen, sind im GTP-gebundenen Zustand aktiv und im GDP-gebundenen Zustand inaktiv (Abb. 2). Zur Aktivierung ist der Austausch von GDP gegen GTP notwendig. Dieses Ereignis wird vermittelt durch GEF (*Guanine nucleotide exchange factors*)-Proteine, die auch GNRPs (*Guanine nucleotide releasing proteins*) oder GDSs (*Guanine nucleotide dissociation stimulators*) genannt werden. Dieser Vorgang wird durch GDIs (*Guanine nucleotide dissociation inhibitors*) gehemmt (Boguski & McCormick, 1993; Hall, 2000).

Regulation der monomeren GTPasen

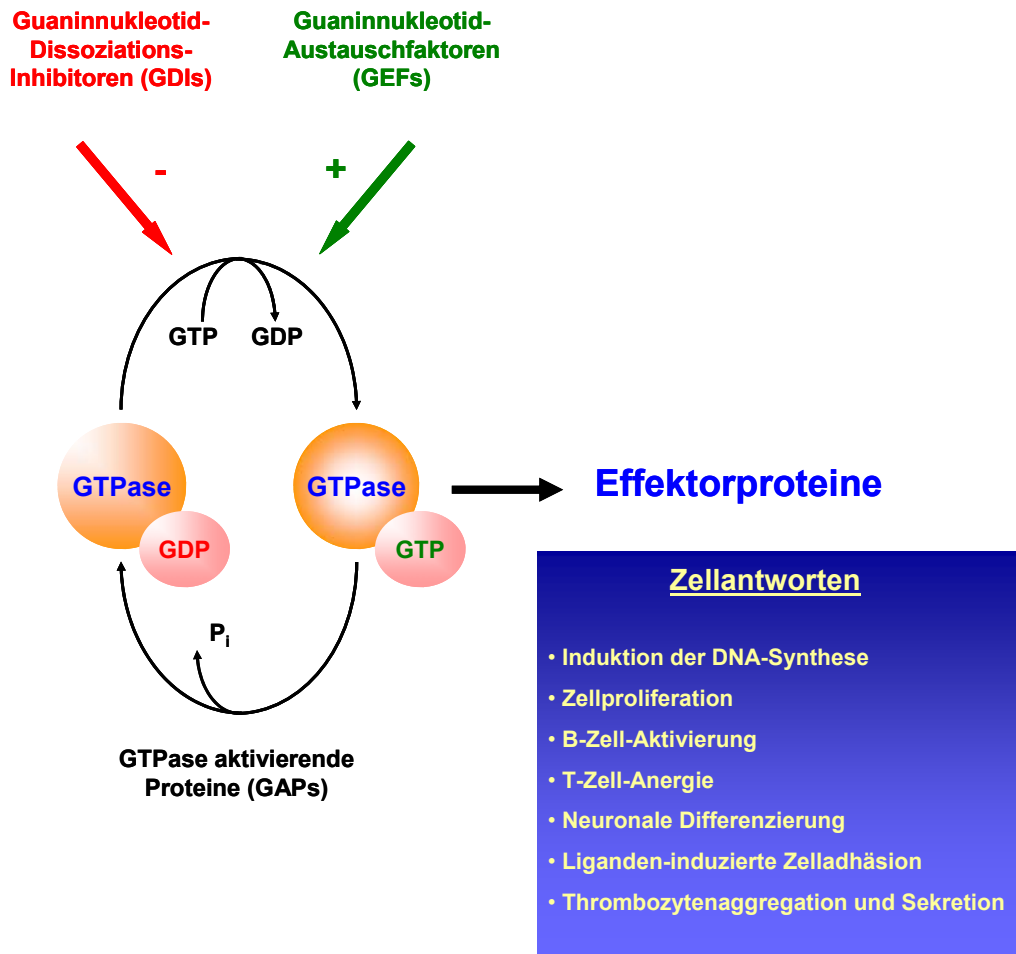


Abbildung 2. Regulationsmöglichkeiten der Rap-GTPasen (De Rooij *et al.*, 2000; Takai *et al.*, 2001; Ehrhardt *et al.*, 2002). Für weitere Erläuterungen siehe Text.

Die Interaktion der monomeren GTPasen mit spezifischen Effektoren ist nur im GTP-gebundenen Zustand möglich. Sowohl die GTP-Beladung als auch die GTP-Hydrolyse unterliegen der Kontrolle durch spezifische regulatorische Proteine. So katalysieren die Guaninnukleotid-Austauschfaktoren die GDP-Dissoziation und die GTP-Beladung, dagegen katalysieren die GTPase-aktivierenden Proteine (GAPs) die GTP-Hydrolyse und damit die Inaktivierung der GTPasen (Hall, 2000; Takai *et al.*, 2001). Die Superfamilie der monomeren GTPasen besteht aus mehr als 100 Mitgliedern, von diesen besitzen Ras- und Rho-ähnliche GTPasen die größte Bedeutung (Abb. 3). Zu den wichtigsten Subfamilien (Hall, 2000; Takai *et al.*, 2001) gehören die Ras-Subfamilie (Regulation von Genexpression, Zellwachstum und Zelldifferenzierung), die Rho-Subfamilie (Regulation des Aktin-Zytoskeletts und der Genexpression), die Rab-Subfamilie (Transport und Umsatz von Membranen), die ARF-Subfamilie (Transport und

Umsatz von Vesikeln) und die Ran-Subfamilie (nukleozytoplasmatischer Transport und Mikrotubulus-Organisation).

Regulation der Ras-Superfamilie monomerer GTPasen

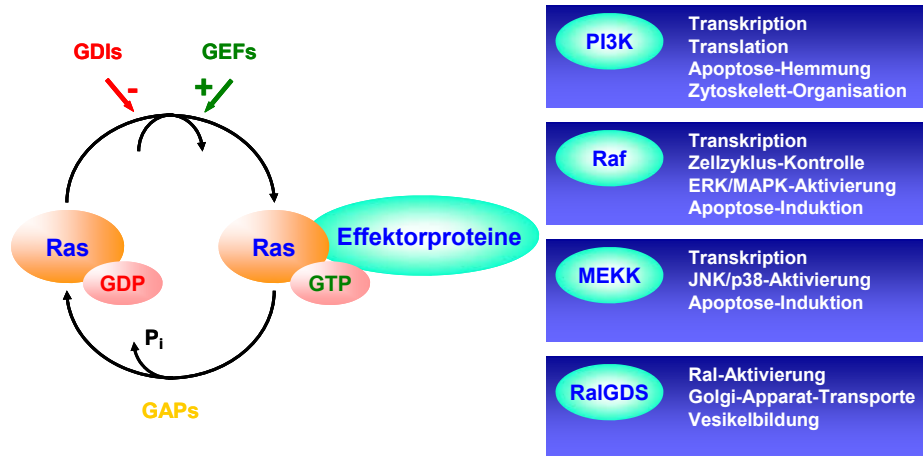


Abbildung 3. Ras-GTPasen kontrollieren verschiedene zelluläre Vorgänge. GAPs, *GTPase activating proteins*, GEFs, *guanine nucleotide exchange factors*, GDIs, *guanine nucleotide dissociation inhibitors*, MEKK, MAP/ERK-Kinase, PI3K, Phosphatidylinositol-3-Kinase, RalGDS, *Ral guanine nucleotide dissociation stimulator*.

1.4 Guaninnukleotid-Austauschfaktoren

Die Signalübertragung zwischen aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinasen und GTPasen der Ras-Familie erfolgt vor allem über SH2/SH3-haltige Adaptorproteine und Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs). Die Aufgabe der GEFs ist es, ein Signal an monomere GTPasen weiterzugeben, wobei diese aus ihrer inaktiven GDP-Form in die aktive GTP-Form überführt werden (Boguski & McCormick, 1993; Hall, 2000; Takai *et al.*, 2001; Quilliam *et al.*, 2002). Die Funktion der GEFs ist damit vergleichbar der Funktion der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die den Nukleotidaustausch an den heterotrimeren G-Proteinen katalysieren (Hall, 2000; Lefkowitz, 2000). Sequenzvergleiche der bisher bekannten Ras-Familie-spezifischen GEFs identifizierten eine gemeinsame Domäne von ca. 200-250 Aminosäuren (Quilliam *et al.*, 2002), der die Nukleotid-Austausch-Aktivität zugeordnet wird, die *CDC25-Domäne* aufgrund ihrer Homologie zum Cdc25-Austauschprotein aus *Saccharomyces cerevisiae* genannt wird und die charakteristisch für die Ras-Familie-spezifischen GEFs ist. Innerhalb dieser Domäne lassen sich drei hochkonservative Sequenzelemente unterscheiden, die durch variable Abschnitte getrennt sind. Als weitere Strukturelemente finden sich eine PH-Domäne sowie

eine Prolin-reiche Bindungsdomäne. Die Prolin-reiche Sequenz dient als Anhaftungsstelle für die SH3-Domäne von verschiedenen anderen Signalproteinen. Die Frage nach dem genauen Mechanismus des Nukleotidaustauschs ist für mehrere GEF-Familien in groben Zügen geklärt. Die Ras-Familie-spezifischen GEFs zeigen eine Bindung an die GDP-Form der Ras-verwandten GTPasen. Dadurch kommt es zur Ablösung von GDP und zur Komplexbildung mit der nukleotidfreien Form der Ras-verwandten GTPasen. Der binäre GTPase-CDC25-Komplex kann durch GDP oder GTP dissoziiert werden. Da in der Zelle ein hoher Überschuss von GTP über GDP gegeben ist, wird die nukleotidfreie GTPase bevorzugt in den GTP-gebundenen, aktiven Zustand übergehen. Die treibende Kraft für den Nukleotidaustausch ist demnach die hohe GTP-Konzentration in der Zelle. Indem die GEFs einen nukleotidfreien Zustand der GTPase stabilisieren, ermöglichen sie die Bindung des G-Nukleotids, das in der höchsten Konzentration in der Zelle vorkommt, nämlich GTP (Goldberg, 1993; Hall, 2000; Takai *et al.*, 2001; Quilliam *et al.*, 2002). Die Regulation der GEFs ist sehr unterschiedlich und schließt nicht nur Adaptorprotein-vermittelte Interaktionen mit einem aktivierten Rezeptor ein. Es gibt andere Ras-Familie-spezifische GEFs, die der Kontrolle durch *second messenger* wie u. a. Ca^{2+} , DAG und/oder cAMP unterliegen (Quilliam *et al.*, 2002). So führt die Aktivierung von einigen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren über die Aktivierung von besonderen G-Protein-Untereinheiten (z. B. von $\text{G}\alpha_s$, aber auch von $\text{G}\beta\gamma$) zur Aktivierung von Adenylycyclasen (AC), die den *second messenger* zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) bilden (Hanoune & Defer, 2001). Dieses Nukleotid reguliert die Proteinkinase A (PKA), die eine Vielzahl von Effektorproteinen (insbesondere des Kohlenhydratstoffwechsels, aber auch von Raf) phosphorylieren und deren Aktivitätszustand beeinflussen kann. Eine andere Funktion von cAMP (Beavo & Brunton, 2002; Bos, 2003) besteht in der Regulation des Ca^{2+} -Durchtritts durch Kationenkanäle und in der Aktivierung von spezifischen Austauschfaktoren wie Epac1/2 (*exchange protein activated by cAMP*).

1.4.1 Ca^{2+} /DAG-regulierte Austauschfaktoren

In den letzten Jahren ist eine Familie von vier GEFs (Abb. 4) beschrieben worden, die Ca^{2+} /DAG-Bindungsmotive, eine zentrale CDC25-Homologie-Domäne, zwei C-terminal von dieser Domäne gelegene, Ca^{2+} -bindende EF-Motive und eine C-terminale DAG/Phorbolester-bindende C1-Domäne enthalten (Quilliam *et al.*, 2002). Diese C1-Domäne ist der in klassischen und atypischen PKC-Isoformen vorkommenden C1-Domäne sehr ähnlich (Kazanietz, 2000). Während die C1-Domänen von RasGRP1 und RasGRP3 DAG-Analoga *in vitro* binden können, konnte diese Bindung an die C1-Domänen von RasGRP2 oder RasGRP4 bisher nicht nachgewiesen werden (Teixeira *et*

al., 2003). RasGRP1 (früher: CalDAGII) aktiviert H-Ras *in vitro* und ist an der H-, K- und N-Ras-vermittelten *Mitogen activated protein* (MAP)-Kinase-Aktivierung und NIH-3T3-Transformation in Fibroblasten beteiligt (Ebinu *et al.*, 1998; Tognon *et al.*, 1998). RasGRP2 (früher: CalDAGI) aktiviert Rap1 *in vivo* und führt an der Plasmamembran zur Aktivierung von N- und K-Ras (Clyde-Smith *et al.*, 2000). Von RasGRP2 existieren zwei verschiedene Isoformen, die sich durch die Ab- oder Anwesenheit eines aus 62 Aminosäuren bestehenden, N-terminal gelegenen Peptids unterscheiden, das eine Myristoylierungs- oder Palmitoylierungsstelle enthält, für die Lokalisation an der Plasmamembran zuständig ist und damit die N- und K-Ras-Aktivierung ermöglicht (Springett *et al.*, 2004). RasGRP3 (früher: CalDAGIII) aktiviert Rap1A, Rap2A, H-Ras, R-Ras, TC21 (entspricht R-Ras2) und in einem geringeren Maß M-Ras (entspricht R-Ras3) (Ohba *et al.*, 2000a; Rebhun *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 2000). RasGRP4 agiert als Austauschfaktor für Ras in einer Kation (Ca^{2+} - und Mg^{2+} -) abhängigen Weise (Reuther *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2002, Madani *et al.*, 2004). Relativ gut charakterisiert wurde die GTPase-Spezifität dieser Ca^{2+} /DAG-regulierten Austauschfaktoren *in vitro*, hingegen liegen nahezu keine Kenntnisse über die Aktivierung dieser Austauschfaktoren durch Membranrezeptoren vor.

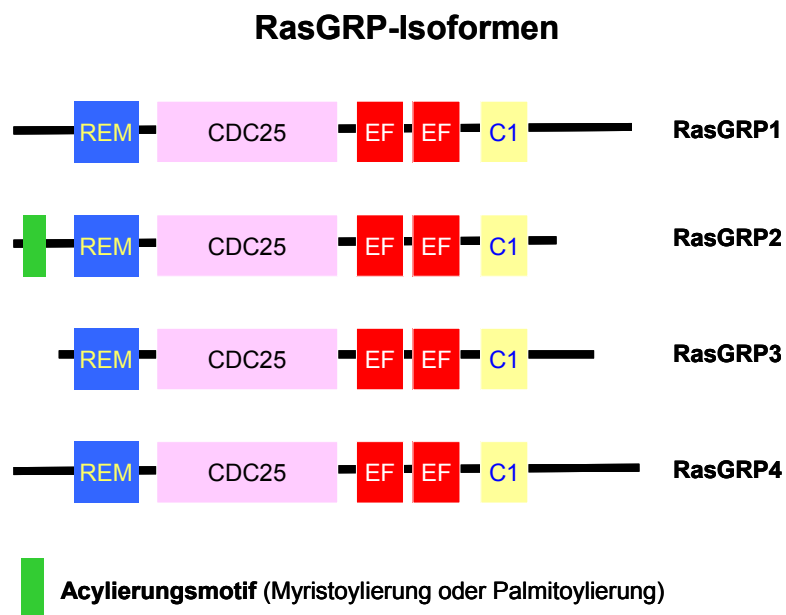


Abbildung 4. Domänenstruktur der verschiedenen RasGRPs. REM, *Rap/Ras exchange motif*. Die katalytische Region der GEFs besteht aus der enzymatischen CDC25/GEF-Domäne und der REM-Domäne, die der Stabilisierung der GEF-Domäne dient (Clyde-Smith *et al.*, 2000; De Rooij *et al.*, 2000; Brose *et al.*, 2002; Reuther *et al.*, 2002; Springett *et al.*, 2004).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, über welche Signalwege der endogen in HEK-293-Zellen exprimierte und an die PLC- γ_1 -gekoppelte EGF-Rezeptor die PLC- ϵ stimulieren kann. Dabei wurde ein Augenmerk auf die Beteiligung von Ca^{2+} /DAG-regulierten Austauschfaktoren, monomeren GTPasen und zytoplasmatischen Tyrosinkinasen gelegt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 (Bio-)Chemikalien

<u>Name</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
A23187	Biomol
Aceton	Baker
Acrylamid	Serva
AG1478	Calbiochem-Merck Biosciences
Agarose ultraPURE	Gibco BRL / Invitrogen
Ampicillin	Grünenthal
Aprotinin	Sigma
APS	Serva
ATP	Roche Molecular Biochemicals
Bacu-Primer	Invitrogen
BAPTA/AM	Calbiochem-Merck Biosciences
BCA Protein Assay Kit	Pierce
Benchmark Prestained Proteine Standard	Invitrogen
Benzamidin	Sigma
Bisacrylamid	Serva
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Fluka
BSA	Biomol
BSA (fettfrei)	Sigma
Calciumchlorid	Merck
Chloroquin	Sigma
Coomassie Brilliant Blau R250	Roth
Coomassie-Blau G	Serva
Diethylether	Merck
Digitonin	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
DNA-Größenstandard Gene-Ruler	Fermentas
dNTP-Mix	Fermentas
DTT	Invitrogen oder Serva

DMEM/F-12-Medium	Gibco BRL / Invitrogen
DMSO	Sigma
ECL-Westernblot-Reagenz	PerkinElmer Life Sciences
EDTA	Merck
EGF	Biomol
EGTA	Merck
Erststrangpuffer	Invitrogen
Essigsäure (96%-99%)	Baker
Ethanol	Baker
Ethidiumbromid	Roth
FKS	Invitrogen
Fura-2/AM	Molecular Probes, MoBiTec
Geneticin (G418)	Invitrogen
D(+)-Glukose	Merck
Glutathion-Sepharose-Beads 4B	Amersham
Gö6976	Calbiochem-Merck Biosciences
Glycerol	Fluka
Glycin	Sigma
RasGRP-Primer	Invitrogen
HEPES	Serva
IPTG	Roth
Ionomycin	Biomol
Isopropanol	Baker
Kaliumacetat	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Ladepuffer (Loading Dye Solution)	Fermentas
LB-Agar	Gibco BRL / Invitrogen
LB-Base	Gibco BRL / Invitrogen
Leupeptin	Sigma
Ligasepuffer	Promega
Lipofectamin	GibcoBRL
Magermilchpulver	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Manganchlorid	Merck
2-Mercaptoethanol	Merck

Methanol	Baker
Molekulargewichtstandards (HMW und LMW)	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdesoxycholat	Sigma
Natriumdodecylsulfat	Serva
Natriumfluorid	Sigma
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumorthovanadat	Merck
Natriumpyrophosphat	Sigma
<i>Ndel</i> -Puffer	New England Biolabs
Neomycin	Sigma
Neutralrot	Roth
Nonidet P-40	Fluka
<i>NotI</i> -Puffer	New England Biolabs
oligo-dT ₁₅ -Primer	Invitrogen
Penicillin	Gibco BRL / Invitrogen
Phosphorsäure (85%)	Merck
Plasmid Mega Kit	Qiagen
Plasmid Midi Kit	Qiagen
PMSF	Roche Molecular Biochemicals
Poly-D-Lysin (MG: >300 kDa)	Sigma
Polyethylenglykol	Sigma
Poly-L-Lysin (MG: >300 kDa)	Seromed
Ponceau S	Sigma
PP ₂	Calbiochem-Merck Biosciences
p-Phenylendiamin	Sigma
Precision Plus Proteine Standard All Blue	Biorad
Protein A-Agarose-Beads	Santa Cruz Biotechnology
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Raytide-Kontrollsubstrat	Calbiochem-Merck Biosciences
Rinder- γ -Globulin (Proteinstandard)	Biorad

RNasin	Promega
RNeasy Mini Kit	Qiagen
Rotiblock	Roth
Saccharose	Merck
<i>Sall</i> -Puffer	Fermentas
Salzsäure (37%)	Merck
SDS	Serva
SOC-Medium	Invitrogen
Sojabohnen-Trypsininhibitoren	Sigma
Streptomycin	Gibco BRL / Invitrogen
<i>Taq</i> -PCR Master Mix Kit	Qiagen
TCA	Merck
TEMED	Serva
TNM-FH-Insect Medium	Sigma
Tris-Base	Merck
Triton X-100	Roth
Tween 20	Sigma
<i>Xho</i> I-Puffer	Gibco BRL / Invitrogen

2.1.2 Radioaktive Chemikalien

<u>Name</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
[³ H]IP ₃ (21 Ci/mmol)	PerkinElmer Life Sciences
[γ- ³² P]ATP	ICN

2.1.3 Antikörper, Enzyme und Toxine

<u>Name</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
Alexa-488 anti-Maus IgG (H+L) Konjugat der Ziege	Molecular Probes, MoBiTec
anti- <i>c-myc</i> -Antikörper 9E10 (Maus)	Roche Molecular Biochemicals
anti- <i>c-Src</i> -Antikörper (Maus)	Sigma
anti-EGF-Rezeptor-Antikörper (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology
anti-GST-Antikörper (Ziege)	Santa Cruz Biotechnology
anti-HA-Antikörper 12CA5 (Maus)	Roche Molecular Biochemicals
anti-Kaninchen IgG (Peroxidase-Konjugat der Ziege)	Sigma
anti-Maus IgG (Peroxidase-Konjugat der Ziege)	Dianova

anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY20 (Maus)	Santa Cruz Biotechnology
anti-PLC- γ 1-Antikörper (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology
anti-PLC- ϵ -Antikörper (Kaninchen)	Dr. J.W. Lomasney
anti-Rap2-Antikörper (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology
anti-Ziege-IgG (Peroxidase-Konjugat des Kaninchens)	Sigma
c-Src-Kinase (rekombinant)	Calbiochem-Merck Biosciences
Glutathion-S-Transferase1	Calbiochem-Merck Biosciences
<i>Nde</i> I	New England Biolabs
<i>Not</i> I	New England Biolabs
RNase A (DNase-frei) oder H	Promega
<i>Sal</i> I	Fermentas
SuperScript II Reverse Transkriptase	Invitrogen
T4 DNA-Ligase	Promega
<i>Xho</i> I	Gibco BRL / Invitrogen

2.1.4 Plasmide

<u>Name</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
pcDNA3	
C3G	Dr. J.L. Bos
<i>c-myc-getaggte</i> PLC- ϵ	Dr. J.W. Lomasney
<i>c-myc-getaggte</i> H1144L PLC- ϵ	Dr. J.W. Lomasney
pCMV2	
H335Q PLC- γ 1	Dr. P.G. Suh
pRK5	
PLC- γ 1	Dr. A. Ullrich
G12V Rap2B	Dr. J.W. Lomasney
HA- <i>getaggtes</i> K298M c-Src	Dr. J.T. Parsons
HA- <i>getaggtes</i> K457A Pyk ₂	Dr. A. Blaukat
S17N Rap1A	Dr. J. de Gunzburg
S17N Rap2B	Dr. J. de Gunzburg
pRSV	
S17N Ras	Dr. J. L. Bos

pMT2-HA

HA-getaggtetes Epac1	Dr. J. de Rooij
HA-getaggtetes PDZ	Dr. J. de Rooij
HA-getaggtetes RasGRP1	Dr. J. de Rooij
HA-getaggtetes RasGRP2	Dr. J. de Rooij
HA-getaggtetes RasGRP3	Dr. J. de Rooij
HA-getaggtetes Repac	Dr. J. de Rooij

pGEX

GST-getaggtetes RalGDS-RBD	Dr. J. de Rooij
GST-getaggtetes Rap2B	Dipl.-Chem. H. Rehmann

2.1.5 Expressionsvektor-Systeme

<u>Name</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
linearisierte BaculoGold Baculovirus-DNA	Pharmingen
Transfervektor pAcGHLT-C	Pharmingen

2.1.6 Bakterien

<u>Name</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
<i>E.coli</i> -Stamm DH5 α	Fermentas

2.1.7 Zelllinien

<u>Name</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
HEK-293-Zellen	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)
Sf9-Zellen	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)

2.1.8 Sonstige Verbrauchsmaterialien

<u>Material</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
Anionenaustauscherharz AG 1-X8	Biorad
Anionenaustauscherharz AG 50-X8	Biorad
Blot-/Chromatografiepapier	Whatman
Deckgläser	Engelbrecht

Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf
Filmentwickler Lösung Neutol Liquid NE Agfa	Agfa Gevaert
Filmfixierer Lösung Agefix	Agfa Gevaert
GF/C-Filter	Whatman
Kanüle 20-Gauge (0,9-mm)	BD Microlance
Kodak X-OMAT AR-Filme	Kodak
Kryoröhrchen	Greiner
MiniProtean III-System	Biorad
Nitrozellulosemembran	Advance Microdevices
Objektträger	Engelbrecht
Pasteurpipetten	Brand
Plastik-Einmalmessküvetten	Sarstedt
Polyprep Chromatography Columns	Biorad
Polystyrol-Einmalküvetten	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 3,5 ml und 6,5 ml)	Sarstedt
Skalpell Feather Gr.10 (Einmalskalpell)	Param
Snap-cap-Röhrchen	Sarstedt
Sorval Zentrifugenbecher	Sorval
Sterilfilter (0,22-µm)	Sartorius
Szintillationspuffer Emulsifier Szintillator Plus 299	Packard
Szintillationsgefäße	Packard
Verstärkerfolien	Kodak
6-Well-Platten	Falcon
Zahnstocher	Fackelmann
Zellkulturschalen (35-, 60- und 145-mm)	Falcon
Zellkulturflaschen (25 und 75 cm ²)	Falcon oder Greiner
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultivierung

2.2.1.1 Kultivierung von HEK-293-Zellen

(Schmidt *et al.*, 1994)

Die Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank (LaminarAir HA 2472 GS, Heraeus) durchgeführt. Die dafür erforderlichen Arbeitsgeräte wurden für 20 min bei 121°C autoklaviert, benötigte Lösungen oder Medien wurden steril filtriert. Bei den Pipetten, Zellkulturflaschen bzw. -schalen und anderen Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden sterile Einwegsmaterialien aus Kunststoff verwendet (Falcon oder Greiner).

In den dargestellten Versuchen wurden *human embryonic kidney* (HEK)-293-Zellen eingesetzt, die endogen den Tyrosinkinase-Rezeptor für den Wachstumsfaktor EGF exprimieren (Voß *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2000). Die Zellen wurden in 20 ml Wachstumsmedium (DMEM/F-12, 10% FKS (v/v), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) auf 145-mm-Zellkulturschalen in einem Brutschrank (B5060 EK/CO₂, Heraeus) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Die Zellen wurden vor Versuchsbeginn auf mit Poly-L-Lysin (MG >300 kDa, Konzentration 0,05-0,1 mg/ml) beschichteten 35- oder 60-mm-Zellkulturschalen umgesetzt, um eine bessere Anheftung der Zellen an die Kunststoffoberfläche zu erreichen. Zur optimalen Stimulation der Zellen mit dem Tyrosinkinase-Rezeptor-Agonisten EGF wurde 36 h vor Versuchsbeginn das FKS-haltige gegen FKS-freies DMEM/F-12-Wachstumsmedium ausgetauscht (Serumdepletion).

Zur Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen im Medium abgelöst, 5 min bei RT zentrifugiert (1700 U/min, Megafuge 1.0 R, Heraeus) und in 1 ml Einfriermedium (45% (v/v) DMEM/F-12, 45% (v/v) FKS und 10% (v/v) DMSO) resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde auf Kryoröhrchen aufgeteilt und für 24 h bei -70°C gelagert. Danach wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Kultivierung der Zellen wurden die entsprechenden Kryoröhrchen zügig aufgetaut, in Wachstumsmedium (*plus* 10% FKS und *plus* 1% Penicillin/Streptomycin) überführt und 5 min bei RT und 800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden auf 145-mm-Zellkulturschalen ausgesät und anschließend für die entsprechenden Versuche kultiviert.

DMEM/F-12-Medium (pH 7,15):	60 g DMEM/F-12
	12,2 g NaHCO ₃
	ad 5 l dH ₂ O

2.2.1.2 Kultivierung von Sf9-Zellen

(Srinivasan *et al.*, 1997)

Sf9-Zellen sind Insekten-Ovarialzellen von *Spodoptera frugiperda*. Diese wurden in Zellkulturflaschen mit TNM-FH-Medium kultiviert, das zusätzlich 10% (v/v) FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin enthielt. Die Kultivierung erfolgte bei 27°C in einem Brutschrank ohne CO₂-Begasung (HERAcool 40, Heraeus). Sf9-Zellen, die mit Baculovirus infiziert worden waren und ein GST-*getaggt*es Fusionsprotein exprimierten, wurden in 145-mm-Zellkulturschalen oder in 6-Well-Platten bis zur Konfluenz in Kultur gehalten.

Zur Lagerung der Zellen wurden diese zunächst in Medium abgelöst und 5 min bei RT abzentrifugiert (800 U/min, Megafuge 1.0 R, Heraeus). Das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium bestehend aus 45% (v/v) TNM-FH, 45% (v/v) FKS und 10% (v/v) DMSO resuspendiert. Diese Suspension wurde für 24 h bei -20°C und dann für kurze Zeit bei -70°C gelagert. Schließlich erfolgte die eigentliche Lagerung in flüssigem Stickstoff.

Beim Auftauen der Sf9-Zellen wurde die Zellsuspension in TNM-FH-Medium (*plus* 10% FKS und *plus* 1% Penicillin/Streptomycin) überführt und 5 min bei RT zentrifugiert (800 U/min, Megafuge 1.0 R, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in TNM-FH-Medium (*plus* 10% FKS und *plus* 1% Penicillin/Streptomycin) resuspendiert. Die Zellen wurden in einer 25-cm²-Zellkulturflasche ausgesät und für 1 h inkubiert. Sobald die Zellen adhärent waren, wurde das Medium entfernt. Die Zellen wurden resuspendiert, in eine 75-cm²-Zellkulturflasche überführt und in TNM-FH-Medium kultiviert.

TNM-FH-Medium (pH 6,0-6,2):	255,9 g TNM-FH Insect Medium
	1,75 g NaHCO ₃
	ad 5l dH ₂ O

2.2.2 Präparation und Transformation kompetenter Bakterien

2.2.2.1 Präparation kompetenter Bakterienzellen

(Asubel *et al.*, 1989; Samboock *et al.*, 1989)

Der *E. coli*-Stamm DH5 α wurde unter sterilen Bedingungen (Microflow Klasse 2 Sicherheitswerkbank, Heraeus) zum Animpfen von 500 ml LB-Medium verwendet. Dazu wurde der Stamm aus der Glycerinkultur auf LB-Festmediumplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine einzelne Kolonie gepickt, in 10 ml LB-Flüssigmedium inokuliert und über Nacht bei 37°C und 180 U/min in einem Warmluftschüttler (Certomat, Braun) bebrütet. Am folgenden Tag wurden 5 ml der Bakteriensuspension in 500 ml Flüssigmedium überführt und wieder im Warmluftschüttler für etwa 2-4 h inkubiert, bis die Zellen eine optische Dichte (OD bei 550 nm) von 0,5 erreichten. Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde die Zellsuspension 5 Minuten lang bei 4°C und 4000 U/min (Sorvall RC-5B, DuPont) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment wurde in 150 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (50 mM) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen, das Bakteriensediment in 8 ml eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen und 1 h inkubiert. Anschließend wurden 8 ml einer CaCl₂-Lösung mit 40% Glycerol (v/v) hinzugefügt. Daraus gewonnene Aliquots (100 oder 200 μ l) wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.2.2 Transformation kompetenter Bakterienzellen

(Asubel *et al.*, 1989; Samboock *et al.*, 1989)

100 μ l der präparierten DH5 α -Bakterien wurden mit 1-10 μ l Plasmid-DNA vermischt und 15 min lang auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien zunächst 90 s bei 42°C, dann für 5 min bei 4°C und nach Zugabe von 300 μ l SOC-Medium für 1 h im Warmluftschüttler bei 37°C und 180 U/min inkubiert. Aliquots dieses Transformationsansatzes wurden auf LB-Festmediumplatten mit Ampicillin ausgestrichen. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank (GTR 0241, Memmert).

LB-Festmediumplatten:	32 mg/ml LB-Agar
	100 μ g/ml Ampicillin

LB-Flüssigmedium: 40 mg/ml LB-Base
100 µg/ml Ampicillin

SOC-Medium: 20 g Trypton
5 g Hefeextrakt
3,96 g Glukose x 6H₂O
2,03 g MgCl₂ x 6H₂O
0,58 g NaCl
0,19 g KCl
ad 1 l dH₂O

2.2.2.3 Präparation von Plasmid-DNA

(Birnbaum & Doly, 1979)

Um cDNA zu präparieren und zu reinigen, wurde eine Einzelkolonie des Plasmid-tragenden Bakterienstammes von der Agarplatte in ein mit 3 ml LB-Flüssigmedium (*plus* 100 µg/ml Ampicillin) gefülltes *Snap-cap*-Röhrchen (Sarstedt) überführt und für etwa 8 h bei 37°C und 180 U/min im Warmluftschüttler (Certomat, Braun) inkubiert. Danach wurde die Bakterienkultur in ein größeres Volumen mit Ampicillin versetzten LB-Flüssigmediums überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte über Nacht unter den gleichen, oben genannten Bedingungen. Die Bakterien wurden am nächsten Tag in der Zentrifuge für 15 min bei 4°C und 6000 U/min (Sorvall RC-5B, DuPont) pelletiert. Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde das Plasmid Mega Kit (Qiagen) verwendet. Dabei wurden die Bakterien mittels Resuspension in einer NaOH/SDS-haltigen Lösung zunächst alkalisch lysiert und danach unter angepassten Bedingungen (pH 7,0; niedrige Salzkonzentrationen) auf ein Anionenaustauscherharz (Qiagen) aufgetragen. RNA, Proteine und Verunreinigungen wurden durch Waschen mit einer höher konzentrierten Salzlösung von der Säule entfernt. In den nächsten Schritten wurde die cDNA mit Hilfe einer hochkonzentrierten Salzlösung eluiert, danach durch Ethanol (70%) präzipitiert und in 30 µl TE-Puffer resuspendiert. Die cDNA-Konzentration der Reinigungen wurde mittels UV-Spektrophotometrie bei 260 nm (LKB Biochrom Ultrospec II, Pharmacia) bestimmt.

TE-Puffer (pH 8,0): 10 mM Tris-Base
1 mM EDTA

2.2.3 Nachweis von RasGRP (1-3) mittels Reverser Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

2.2.3.1 Restriktionsverdau und Reverse Transkription

(Sellner *et al.*, 1992 ; Stope *et al.*, 2004)

Aus HEK-293-Zellen wurden die genomische DNA (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) und die Gesamt-RNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen) präpariert. Um eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit RNA als Ausgangssprobe durchzuführen, muss die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Die cDNA-Synthese an RNA-Matrizen wird als Reverse Transkription (RT) bezeichnet. Dabei fungiert ein gegensätzlich orientiertes Oligonukleotid als Primer. RT und PCR können entweder nacheinander in dem gleichen Röhrchen durchgeführt werden (Einschritt-RT-PCR) oder getrennt voneinander (Zweischritt-RT-PCR). Die Einschritt-RT-PCR benötigt genspezifische Primer, die Zweischritt-RT-PCR wird im Allgemeinen mit oligo-dT-Primern im RT-Schritt und mit genspezifischen Primern im PCR-Schritt durchgeführt. Die RNA-abhängige DNA-Polymerase, die diese Reaktion katalysiert, ist die Reverse Transkriptase. Eingesetzt wurde die SuperScript II Reverse Transkriptase (Invitrogen), ein rekombinantes Enzym ohne RNase H-Aktivität, das eine komplementäre DNA an einzelsträngiger RNA synthetisiert. Sämtliche Reaktionsschritte wurden in einem Thermocycler (Tpersonal, Biometra) durchgeführt. Um Lösungen während der RT-Reaktion zum Reaktionsansatz hinzugeben zu können, wurden die Ansätze aus dem Gerät genommen und auf Eis gestellt.

Zur Vorbereitung der RT-Reaktion wurden die präparierte RNA-Lösung (etwa 1-3 µg Gesamt-RNA), der oligo(dT₁₅)-Primer (2 pmol bzw. 500 ng) und 1 µl dNTP-Mix (jeweils 20 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) mit dH₂O auf 12 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde gemischt und kurz herunterzentrifugiert und die RNA wurde 5 min lang bei 65 °C denaturiert. Während der Ansatz auf Eis stand, wurden 4 µl Erststrangpuffer (5x; Invitrogen), 2 µl DTT (100 mM; Invitrogen) und 1 µl RNasin (40 U/µl; Promega) hinzugefügt. Der Ansatz wurde wieder gevortext, kurz herunterzentrifugiert, für 2 min bei 42 °C inkubiert und auf Eis gestellt. DTT diente zur Denaturierung und Stabilisierung der RNA-Stränge und RNasin ist ein RNase-Inhibitor.

Nach Zugabe von 1 µl SuperScript II Reverse Transkriptase (200 U/µl; Invitrogen), kurzem Vortexen und Herunterzentrifugieren des Ansatzes kam es zur Erststrangsynthese bei Inkubation für 50 min bei 42°C. Anschließend wurde die Polymerase für 10 min bei 70°C thermisch inaktiviert. Der Ansatz wurde zunächst auf Eis gestellt und bei 4°C oder bei -20°C

gelagert, bevor 2 µl dieses Ansatzes mit der hergestellten cDNA bei der folgenden RT-PCR weiter verwendet wurden.

2.2.3.2 Polymerasekettenreaktion und DNA-Agarosegel-Elektrophorese

(Saiki *et al.* 1985)

Für die Polymerasekettenreaktion wurden der *Taq* PCR Master Mix (Qiagen), 2 µl cDNA und Primerpaare eingesetzt, die jeweils ein einzelnes Intron von RasGRP1 (vorwärts 5'-actaacaccttcaaagccaccagtag-3', rückwärts 5'-tcttgagaaatgtatccatcctgggc-3'), von RasGRP2 (vorwärts 5'-gaagcggcaggtgactcagcggaac-3', rückwärts 5'-agaggagatgaaccgctccaggac-3') und von RasGRP3 (vorwärts 5'-gtggagccaattgtcacaacagtg-3', rückwärts 5'-gcctgtaaccagtgtgatggctctg-3') umgeben. Der *Taq* Master Mix enthält die *Thermus aquaticus* (*Taq*)-Polymerase, PCR-Puffer und dNTPs.

PCR-Ansatz: 25 µl *Taq*-PCR Master Mix
 17 µl dH₂O
 2 µl Primer 1
 2 µl Primer 2
 2 µl MgCl₂ (25 mM)
 2 µl Template vom RT-Ansatz

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Tpersonal, Biometra) durchgeführt. Dabei wurde der Ansatz für den Reaktionsschritt der Erststrangsynthese 30 min lang bei 55 °C inkubiert. Die weiteren PCR-Schritte verliefen nach dem folgenden Temperaturprogramm:

- | | | |
|----|-------|------|
| 1) | 95°C | 3' |
| 2) | 94°C | 15'' |
| 3) | AT °C | 30'' |
| 4) | 72°C | 30'' |
| 5) | 72°C | 5' |
| 6) | 4°C | ∞ |

Die Temperaturschritte 2 bis 4 wurden 45-Mal wiederholt. Die Annealing-Temperatur (AT) betrug je nach Template für RasGRP1 53°C, für RasGRP2 58°C und für RasGRP3 53°C. Als Negativkontrolle diente eine PCR ohne DNA, als Positivkontrolle eine PCR mit 2 µl genomischer DNA.

Die amplifizierten DNA-Sequenzen wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese getrennt. Dazu wurde ein 1%-iges Gel aus Agarose *ultraPure* mit TBE-Puffer (0,5x) und Ethidiumbromid (50 µl/l) gegossen. Dann wurden jeweils 5 µl der PCR-Proben sowie 5 µl DNA-Größenstandard (GeneRuler, Fermentas) in den Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung der Proben fand bei einer angelegten Spannung von 100 V für 30 bis 45 min statt.

TBE-Puffer (0,5x): 3,025 g Tris-Base
 1,5425 g Borsäure
 0,186 g EDTA
 ad 1 l dH₂O

2.2.4 Transfizierung von Zellen

2.2.4.1 Transfizierung von HEK-293-Zellen

(Chen & Okayama, 1988)

Zur Transfizierung wurde die Calciumphosphat-Methode verwendet, bei der eine Effizienz von 50%-80% erreicht wurde. Dabei wird die betreffende Plasmid-DNA in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und mit sterilem dH₂O auf 80 µl aufgefüllt. Die DNA wurde durch Zugabe von 20 µl auf pH 5,2 eingestellte, und mit 3-molarer, steriler Natriumacetatlösung und 250 µl Ethanol (100%) ausgefällt. Anschließend wurde für 15 min bei 4°C und 13000 U/min zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus). Der Überstand wurde abgenommen und nach Trocknen der Pellets erfolgte die Resuspension in 700 µl sterilem dH₂O. Die Suspension wurde in 300 µl steriler 2 M CaCl₂ überführt. Dazu wurde tropfenweise unter vorsichtigem Schütteln 1 ml steriles 2x HeBS (2x HEPES-gepufferte Salzlösung) hinzugefügt und nach mehrmaligem Schütteln für 5 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden 200 µl Chloroquin-Lösung tropfenweise auf die Zellen gegeben. Dann wurden die DNA-Präzipitate auf die 145-mm-Zellkulturschalen pipettiert und die weitere Inkubation der Zellen mit der DNA erfolgte für 4 h im Brutschrank (B5060 EK/CO₂, Heraeus). Danach wurden das Medium abgesaugt und durch Spülen mit 10 ml FKS-freiem Medium überschüssige DNA-Reste entfernt. Die weitere Zellkultivierung zur Versuchsvorbereitung erfolgte in 20 ml FKS-haltigem Medium.

(Schmidt *et al.*, 2000)

Mit den erhaltenen Ansätzen wurde der unten beschriebene IP₃-Rezeptorbindungs-Assay durchgeführt, für den ein Bindungsprotein benötigt wird, das aus boviner Nebennierenrinde gewonnen wird. Dazu wurde zunächst das Mark der Rindernebennieren entfernt. Die Rinde wurde auf Eis gelagert pro g Eigengewicht mit 2 ml Homogenisierungspuffer vermischt und durch fünf 20 s-Zyklen mittels Ultraschall (Ultra-Turrax, Stufe 5-6, Janke & Kunkel) zerkleinert. Das erhaltene Lysat wurde für 10 min bei 4°C und 5000 U/min (Megafuge 1.0 R, Heraeus) zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um eine bessere Reinigung zu erreichen, wurde der Vorgang wiederholt, indem das Pellet in Homogenisierungspuffer resuspendiert und durch Ultraschall zerkleinert wurde. Nach der zweiten Zentrifugation wurde der Überstand zum aufbewahrten Überstand des ersten Zentrifugationsschrittes hinzugegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde für 20 min bei 4°C und 15000 U/min zentrifugiert (Sorvall RC-5B, DuPont). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Homogenisierungspuffer resuspendiert und es wurde erneut zentrifugiert. Nachdem dieser Vorgang insgesamt fünfmal durchgeführt worden war, wurden die einzelnen Pellets in jeweils 8 ml Homogenisierungspuffer gelöst und zusammengeführt.

Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode bestimmt und auf eine Konzentration von 15 mg/ml Protein eingestellt. Aliquots dieses Ansatzes konnten bis zu 3 Monate bei -80°C aufbewahrt werden.

Der eigentliche Ansatz für den IP₃-Rezeptorbindungs-Assay bestand aus 30 µl gereinigtem Bindungsprotein, 30 µl Assay-Puffer und 30 µl Probe, die in einem 3,5 ml-Reaktionsröhrchen mit 30 µl 0,036 bis 36 pmol [³H]IP₃ (Aktivität pro Ansatz: 5000/s) vermischt und für 30 min bei 4°C inkubiert wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe des eiskalten Waschpuffers abgestoppt. Um eine Trennung des freien IP₃ von dem gebundenen IP₃ zu erreichen, wurden die Proben durch einen GF/C-Filter filtriert. Nach der Filtration der Proben wurde der GF/C-Filter zweimal mit je 3 ml Waschpuffer gewaschen. Die Filter wurden in Szintillationsgefäße überführt und mit 3 ml Szintillationspuffer (Packard Emulsifier Scintillator Plus 299) versetzt. So konnte die Radioaktivität der Proben mit Hilfe eines Szintillationszählers (Beckmann LS 6000 SC) gemessen werden. Der zelluläre Gehalt an IP₃ wurde in pmol x mg⁻¹ Protein angegeben. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte ± deren Standardabweichungen von *n* unabhängigen Experimenten. Alle Versuche wurden grundsätzlich als Dreifachbestimmung durchgeführt.

HBSS (pH 7,4):	118 mM NaCl
	15 mM HEPES
	5 mM D-(+)-Glukose
	5 mM KCl
	1 mM CaCl ₂
	1 mM MgCl ₂
Homogenisierungspuffer (pH 8,0):	20 mM NaHCO ₃
	1 mM DTT
Assay-Puffer (pH 8,0):	100 mM Tris-Base
	4 mM EDTA
Waschpuffer (pH 8,0):	25 mM Tris-Base
	5 mM NaHCO ₃
	1 mM EDTA

2.2.6 Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration

(Grynkiewicz *et al.*, 1985)

Die Zellen wurden von den 145-mm-Zellkulturschalen abgelöst und für 5 min bei 1700 U/min zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus). Die Pellets (enthielten ungefähr 5×10^5 Zellen/ml) wurden in 20 ml HBSS, komplettiert mit 10 mg/ml D-Glukose und 10 mg/ml fettfreiem BSA, resuspendiert. Dann wurde der membranpermeable Ca^{2+} -Indikator Fura-2/AM (0,5 μM) für 1 h im Dunkeln bei RT hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1700 U/min (Megafuge 1.0 R, Heraeus) zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Pellets in HBSS/Glukose/BSA resuspendiert und erneut zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das Pellet in 20 ml HBSS/Glukose/BSA aufgenommen und je 2 ml wurden in Messküvetten (Sarstedt) überführt. In einem Spektrophotometer (Hitachi F-2000) mit alle 500 ms wechselnden Exzitationswellenlängen wurde vor und nach Zugabe der verwendeten Agonisten der fluoreszierende Farbstoff Fura-2 ($\lambda=510$ nm) angezeigt (maximale Anregung bei $\lambda=340$ nm in der Ca^{2+} -gebundenen Form, bei $\lambda=380$ nm in der Ca^{2+} -freien Form) und bei $\lambda=510$ nm somit die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration gemessen. Durch Permeabilisierung der Zellmembran für Ca^{2+} -Ionen wurden die jeweiligen Emissionsmaxima für Fura-2 in der Ca^{2+} -gebundenen Form (Einsatz von 0,03%-iger Digitoninlösung) und durch Chelatbildung für Fura-2 in der Ca^{2+} -freien Form (Einsatz von 15 mM EGTA-Lösung) bestimmt. Mit Hilfe von der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software (Hitachi F-2000) wurde anschließend die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration errechnet.

2.2.7 Bestimmung der Rap-Aktivierung

2.2.7.1 Herstellung von GST-RalGDS-RBD aus *E. coli*

(Franke *et al.*, 1997)

97 Aminosäuren der Ras/Rap-Bindungsdomäne (RBD) des Ral-GEF RalGDS (RalGDS-RBD) wurden als GST-getaggtetes Protein in *E. coli*-Stämmen exprimiert. Durch Kultivierung der *E.coli*-Zellen mit dem GST-RalGDS-RBD-kodierenden Plasmid auf LB-Festmediumplatten mit Ampicillin wurden Plasmid-tragende Kolonien selektioniert. Mit einer Einzelkolonie wurden 100 ml ampicillinhaltiges LB-Flüssigmedium angeimpft und diese über Nacht bei 37°C und 180 U/min im Warmluftschüttler (Certomat, Braun) inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Bakterienkultur zu 900 ml ampicillinhaltigem LB-Medium hinzugefügt. Die weitere Kultivierung der Bakterien erfolgte bis zu einer OD (bei 600 nm) von etwa 0,6. Dann wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 ml IPTG-Lösung (10 mM)

für 3 h bei 37°C induziert. Danach wurde die Zellsuspension für 15 min bei 5000 U/min (Sorvall RC-5B, DuPont) zentrifugiert und die Pellets wurden in insgesamt 40 ml PBS (*plus* $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ /Inhibitoren), das zusätzlich 1 mM Natriumorthovanadat enthielt, resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden die Bakterien auf Eis durch fünf 20 s-Zyklen mittels Ultraschall (Labsonic U, Braun) aufgeschlossen. Das erhaltene Lysat wurde mit 1% Triton X-100 für 20 min bei 4°C im Überkopfschüttler (REAX 2, Heidolph) inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 10000 U/min (Sorvall RC-5B, DuPont), um die zytosolische Fraktion von der Membranfraktion zu trennen. Dazu wurde der Überstand, der die zytosolische Fraktion des Lysats und somit die Fusionsproteine enthält, abgenommen, als 12,5 ml-Aliquots in 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt und bei -4°C aufbewahrt.

Später erfolgte die Bindung der Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose-*Beads*. Um die Kopplung der GST-RalGDS-RBD an die *Beads* zu erreichen, wurden zunächst 1,5 ml *Bead*-Material dreimal mit je 10 ml PBS (*plus* $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) resuspendiert und für 2 min bei 4°C und 4000 U/min (Biofuge 1.0 R, Heraeus) zentrifugiert. Dann wurde ein Aliquot des vorher gewonnenen Lysat-Überstands zu den gewaschenen *Beads* hinzugegeben und die *Beads* wurden mit dem Überstand für wenigstens 30 min bei 4°C im Überkopfschüttler (REAX 2, Heidolph) inkubiert. Anschließend wurde das Material für 2 min bei 4000 U/min zentrifugiert (Biofuge 1.0 R, Heraeus) und in PBS (*plus* $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ /Inhibitoren) zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine gewaschen. Das gewaschene Material enthält die GST-RalGDS-RBD gekoppelt an Glutathion-Sepharose-*Beads* und wurde in 0,7 ml 50 mM Tris-Base (pH 8,0) mit Proteaseinhibitoren (5 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Benzamidin, 1 mM DTT, 5 µg/ml Leupeptin, 1 mM PMSF und 10 µg/ml Sojabohnen-Trypsininhibitoren) aufgenommen. So konnte es bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt werden. Die Konzentration an RalGDS-RBD wurde photometrisch bestimmt, die Reinheit der erhaltenen Proteine wurde durch SDS-PAGE (12,5% (m/v)) und anschließende Coomassie-Färbung überprüft. Dazu wurde das Gel für 30 min in der Coomassie-Färbelösung geschwenkt, die Färbelösung abgekippt und das Gel über Nacht in Entfärbelösung auf dem Schüttler (Bühler, KS10) gewaschen, bis das Gel außerhalb der beladenen Spuren nahezu farblos war. Vor dem Trocknen wurde das Gel gewässert, d. h. zweimal für 15 min in dH₂O geschwenkt. Dann wurde das Gel für 2 h bei 80°C vakuumgetrocknet (BioRad, Modell 543 Gel Dryer).

PBS	137 mM NaCl
(<i>plus</i> Ca ²⁺ /Mg ²⁺ , pH 7,2):	6,5 mM Na ₂ HPO ₄
	2,7 mM KCl
	1,5 mM KH ₂ PO ₄
	0,9 mM CaCl ₂
	0,5 mM MgCl ₂
PBS	100 ml PBS (<i>plus</i> Ca ²⁺ /Mg ²⁺ , pH 7,2)
(<i>plus</i> Ca ²⁺ /Mg ²⁺ /Inhibitoren):	100 µl Benzamidin (10 mg/ml)
	100 µl PMSF (1 M)
	100 µl Sojabohnen-Trypsininhibitoren (10 mg/ml)
	50 µl DTT (1 M)
	10 µl Aprotinin (5 mg/ml)
	10 µl Leupeptin (5 mg/ml)
Coomassie-Färbelösung:	100 mg Coomassie Brilliant Blau R250
	125 ml dH ₂ O
	100 ml Methanol
	25 ml Essigsäure
Entfärbelösung:	600 ml dH ₂ O
	300 ml Methanol
	100 ml Essigsäure

2.2.7.2 **Pull-down Assay** (Franke *et al.*, 1997)

Als Vorbereitung wurden die verwendeten Zellen auf 60-mm-Zellkulturschalen bis zur Konfluenz kultiviert. Um den *Pull-down Assay* durchzuführen, wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen wurden für 10 min bei 37°C in HBSS äquilibriert. Dann erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Agonisten für die in den Legenden angegebenen Zeiten bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Lyse-Puffer abgestoppt. Die Zellen wurden auf Eis gelagert sofort von der Zellkulturschale abgekratzt, in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und anschließend für 10 min bei 4°C und 10000 U/min zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus). Von dem Rap-enthaltenden Überstand wurde etwa 1 ml in je ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, das zuvor mit 15 µg GST-RaIGDS-RBD befüllt

wurde. Alles zusammen wurde für 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler (REAX 2, Heidolph) inkubiert und danach für 2 min bei 4°C und 3000 U/min zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus). Dabei lagerten sich die GST-RalGDS-RBD/Rap-GTP-Komplexe im Sediment ab. Der Überstand wurde verworfen und die beladenen *Beads* wurden mit Lyse-Puffer dreimal gewaschen. Dabei wurde das Pellet mit 1 ml Lyse-Puffer resuspendiert, unter den o. g. Bedingungen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die nach dem letzten Zentrifugationsschritt erhaltenen Sedimente wurden mit 100 µl 3,3x Laemmli-Puffer versetzt und für 10 min bei 95°C denaturiert (Thermoblock, Eppendorf). Danach wurden die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit einem 12,5%-igen (m/v) Polyacrylamidgel-Gel und das Immunoblot-Verfahren wie unten beschrieben durchgeführt. Zur Detektion des aktivierten Rap wurde ein Rap-spezifischer Antikörper (Verdünnung von 1:500) eingesetzt (Schmidt *et al.*, 2001).

Lyse-Puffer (pH 7,5):	10% Glycerol (v/v)
	1% Nonited P-40 (v/v)
	200 mM NaCl
	50 mM Tris-Base
	2 mM MgCl ₂
	1 mM PMSF
	100 nM Aprotinin
	10 µg/ml Benzamidin
	10 µg/ml Sojabohnen-Trypsininhibitoren
	1 µg/ml Leupeptin

3,3x Laemmli-Puffer (pH 7,5):	33% Glycerol (v/v)
	20% 2-Mercaptoethanol (v/v)
	6,6% Natriumdodecylsulfat (m/v)
	0,1% Bromphenolblau (m/v)
	20 mM Tris-Base (0,5 M; pH 6,8)

2.2.8 Immunpräzipitation und Phosphorylierungs-Assay

2.2.8.1 Immunpräzipitation

Zuerst wurden der anti-HA-Antikörper (2 µg) oder der anti-*c-myc*-Antikörper (2 µg) an Protein-A-Agarose (20 µl pro Eppendorf-Reaktionsgefäß) gekoppelt. Die Kopplung erfolgte in RIPA-Puffer für 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler (REAX 2, Heidolph).

Die mit den betreffenden Expressionsplasmiden transfizierten Zellen wurden auf 60-mm-Zellkulturschalen in FKS-freiem Medium kultiviert. Zunächst wurden die Zellen mit HBSS (37°C) gespült, bevor die Zellen ohne oder mit EGF für die in den Legenden angegebenen Zeiten bei 37°C inkubiert wurden. Dann wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer (*plus* 100 µM Natriumorthovanadat) gewaschen. Anschließend wurden 500 µl RIPA-Puffer komplementiert mit 1 mM Natriumorthovanadat, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin sowie 25 µg/ml Aprotinin auf die Zellen gegeben. Der Zellrasen wurde auf Eis abgekratzt und in vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt) überführt, für 10 s durch Vortexen gemischt und für mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden für 10 min bei 4°C und 10000 U/min zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus). Nach Bestimmung des Proteingehalts der Überstände nach der Bradford-Methode wurden 1 mg Protein mit 20 µl *Bead*-Material für 2 h bei 4°C im Überkopfschüttler (REAX 2, Heidolph) inkubiert. Danach wurden die Proben für 2 min bei 4°C und 5000 U/min (Biofuge 13, Heraeus) zentrifugiert, die Überstände wurden verworfen und die präzipitierten Proteine wurden mit jeweils 500 µl RIPA-Puffer (*plus* 1 mM Natriumorthovanadat, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin und 25 µg/ml Aprotinin) resuspendiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, bevor die Pellets in jeweils 100 µl Laemmli-Probenpuffer (2x) resuspendiert und für 10 min bei 95°C erhitzt wurden (Thermoblock, Eppendorf). Anschließend wurden die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und das Immunoblot-Verfahren mit spezifischen Antikörpern gegen *c-myc*, den EGF-Rezeptor, GST, Hämagglutinin, die PLC-γ₁, die PLC-ε, gebundenes Rap2, Src und tyrosinphosphorylierte Proteine wie unten angegeben durchgeführt.

RIPA-Puffer:	1% Nonidet P-40
	0,5% Natriumdesoxycholat
	0,1% Natriumdodecylsulfat
	150 mM NaCl
	50 mM NaF
	50 mM Tris-Base (pH 7,5)
	10 mM Natriumpyrophosphat
	1 mM EGTA
Laemmli-Probenpuffer (2x):	3,5 ml dH ₂ O
	2,5 ml Glycerol
	2,0 ml Natriumdodecylsulfat (10%)
	1,25 ml Tris-Base (0,5 M; pH 6,8)
	0,45 ml 2-Mercaptoethanol
	0,2 ml Bromphenolbau (0,5%)

2.2.8.2 *In vitro*-Phosphorylierung durch c-Src

Zuerst wurde der Master-Mix ohne Substrate für alle Ansätze hergestellt. Nach Zugabe der entsprechenden Substrate (GST, GST-*getaggt*es RasGRP3 und Raytide-Kontrollsubstrat; jeweils 2-3 µg) wurden zu jeder Probe 10 µl [γ -³²P]ATP-Mix (50 µM; 0,75 MBq/Reaktionsgefäß) hinzugefügt und die Phosphorylierungsreaktion gestartet. Die Inkubation der Proben erfolgte unter leichtem Schütteln für 5 bis 30 min bei 30°C (Thermomixer 5436, Eppendorf). Durch Zugabe von 50 µl Laemmli-Puffer (2x) wurde die Reaktion gestoppt und die Proben wurden für 10 min bei 95°C erhitzt (Thermomixer 5436, Eppendorf). Danach wurden die Proben auf Eis gekühlt. Die phosphorylierten Proteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE getrennt, als Molekulargewichtsstandards wurden Benchmark Pre-Stained Protein-Ladder (Invitrogen) und Precision Plus Protein Standard All Blue (BioRad) eingesetzt. Anschließend wurden die im Gel getrennten Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Die Gele wurden dann über Nacht auf einem Schüttler (Bühler, KS10) entfärbt und am nächsten Morgen für 2 h bei 80°C vakuumgetrocknet (BioRad, Modell 543 Gel Dryer). Die getrockneten Gele wurden in Röntgenkassetten mit den zu exponierenden Kodak X-OMAT AR-Filmen eingelegt. Wenn die auf dem Film zu erkennenden Signale intensiv genug waren, erfolgte die Filmbelichtung bei RT ohne Verstärkerfolie. Ansonsten erfolgte die Belichtung der Filme mit Hilfe von Verstärkerfolien bei -20°C.

Alternativ wurden die Phosphorylierungen mit 10 µl einer 1 mM ATP-Lösung (Endkonzentration im Ansatz: 200 µM) durchgeführt. Die phosphorylierten Proteinen wurden mit Hilfe eines anti-Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers im Immunoblot-Verfahren detektiert.

Kinase-Puffer (5x):	100 mM HEPES (pH 7,5)
	50 mM MgCl ₂
	15 mM MnCl ₂
	5 mM Natriumorthovanadat

Master-Mix ohne Substrate:	10 µl Kinase-Puffer (5x)
	2 µl rekombinante c-Src-Kinase (1 U/µl)
	ad 50 µl dH ₂ O

ATP-Mix (50 µM):	1 µl [γ- ³² P]ATP
	2,5 µl ATP-Mg-Lösung (200 µM)
	6,5 µl dH ₂ O

2.2.9 Reinigung von GST-getagtem RasGRP3 aus Sf9-Zellen

2.2.9.1 Herstellung des GST-getaggen RasGRP3

(Kitts & Possee, 1993; Stope *et al.*, 2004)

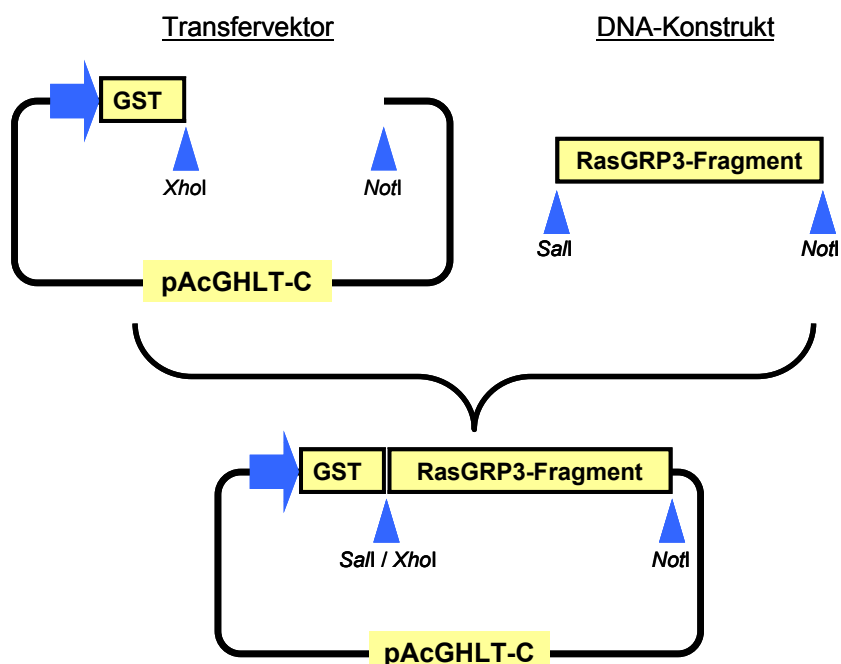


Abbildung 5. Grafische Darstellung des Klonierungsschemas. Der Transfervektor pAcGHLT-C ist ein Derivat des pAcG1-Vektors und weist eine Größe von 8753 bp auf.

2.2.9.2 Restriktionsverdau

Zur Generierung des für RasGRP3 (ältere Nomenklatur CalDAGIII: KIAA0846, GenBank-Zugangsnummer AB020653) kodierenden Baculovirus-Konstrukts wurde der eukaryontische Expressionsvektor pMT2-HA-RasGRP3 durch die Restriktionsendonukleasen *Sall* und *NotI* verdaut. Durch diese Restriktion entsteht ein DNA-Fragment mit einer Länge von 2075 Basenpaaren (bp), das den offenen Leserahmen von RasGRP3 enthält (2070 bp). Die präparative Spaltung wurde mit 5 µl enzyspezifischem Puffer, 0,5 µl BSA-Lösung (200 µg/ml), 5 µl der zu spaltenden DNA (entspricht 5 µg), je 1 µl Restriktionsenzym (*Sall*/*NotI*) und 37,5 µl dH₂O durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden kurz durch Vortexen gemischt, zentrifugiert und für etwa 3 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl Ladepuffer (Loading Dye Solution 6x; Fermentas) abgestoppt. Bei der Restriktion des Transfervektors pAcGHLT-C wurden die Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *NotI* verwendet (Abb. 6). Die dabei entstandenen Fragmente hatten eine Größe von 8722 bp (pAcGHLT-C-Fragment) und 31 bp (Restfragment aus der multiplen Klonierungsstelle). Die Versuchsdurchführung war analog (Menge an BSA-Lösung bei *XhoI*: 2,5 µl). Damit konnte das RasGRP3-DNA-Konstrukt in den Transfervektor subkloniert werden.

<u>Restriktionsenzym:</u>	<u>Schnittstelle:</u>	<u>Konzentration:</u>	<u>BSA-Konzentration:</u>
<i>NdeI</i>	5'-CA [^] TATG-3' 3'-GTAT [^] AC-5'	20 U/µl	200 µg/ml
<i>NotI</i>	5'-GC [^] GGCCGC-3' 3'-CGCCGG [^] CG-5'	10 U/µl	200 µg/ml
<i>Sall</i>	5'-G [^] TCGAC-3' 3'-CAGCT [^] G-5'	10 U/µl	200 µg/ml
<i>XhoI</i>	5'-C [^] TCGAG-3' 3'-GAGCT [^] C-5'	10 U/µl	500 µg/ml

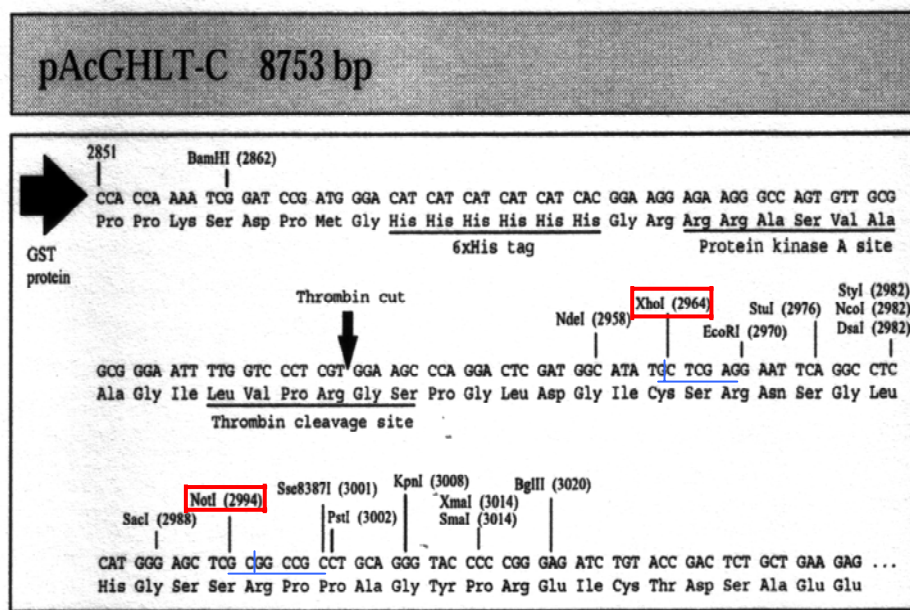


Abbildung 6. Multiple Klonierungsstellen (MCS) des Transfervektors pAcGHLT-C. Die Abbildung entstammt dem Baculovirus Expression Vector System Manual (Instruction Manual, 6th Edition, May 1999, Pharmingen).

2.2.9.3 DNA-Agarosegel-Elektrophorese, - Gelextraktion, - Ligation (Vogelstein & Gillespie, 1978)

Die restringierte DNA wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese getrennt. Dazu wurde ein 1%-iges Gel aus Agarose *ultraPure* mit TBE-Puffer (0,5x) und Ethidiumbromid (50 µl/l) gegossen. Dann wurden jeweils 5 µl Probe sowie 5 µl DNA-Größenstandard (GeneRuler, Fermentas) aufgetragen. Die Auftrennung der Proben fand bei einer angelegten Spannung von 100 V für 30 bis 45 min statt (Abb. 18 im Kapitel „Ergebnisse“).

Um die restringierten DNA-Fragmente ligieren zu können, wurden die vollständigen Restriktionsansätze zuerst gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel präpariert. Dazu wurde ein bis zu 400 mg schweres DNA-Fragment mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel geschnitten und in dem vom Hersteller vorgesehenen Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde unter angepassten Bedingungen (pH: <7,0) auf ein Anionenaustauscherharz aufgetragen. Oligonukleotide, RNA, Proteine und andere Verunreinigungen wurden durch Waschen mit einer höher konzentrierten Salzlösung von der Säule entfernt. In den nächsten Schritten nach dem *QIAquick Gel Extraction Kit Protocol* wurde die DNA mit einer hochkonzentrierten

Salzlösung von der Säule abgelöst, danach durch Ethanol (70%) präzipitiert und in 30 µl TE-Puffer resuspendiert.

Das Verhältnis von Insert zu Vektor wurde nach einem weiteren Testgel abgeschätzt und sollte 3:1 betragen. Der Ligations-Ansatz bestand aus 2 µl Ligasepuffer, 0,5 µl T4 DNA-Ligase, 6 µl Insert und 2 µl Vektor, mit dH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 16°C im Kühlwasserbad inkubiert. Dabei entstand das DNA-Konstrukt pAcGHLT-C[RasGRP3] mit einer Größe von 10797 bp.

2.2.9.4 Kultivierung und Selektion positiver Klone

Zur Amplifizierung erfolgreich ligierter, zirkulärer DNA wurde der Ligationsansatz in retransformierten *E. coli* wie oben beschrieben (Transformation kompetenter Bakterienzellen) eingebracht. Die Transformanten wurden auf Ampicillin-haltigen Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Plasmid-haltige Bakterien konnten durch die auf dem Plasmid kodierte Ampicillin-Resistenz wachsen und bildeten Kolonien identischer Klone.

Zur Selektion von positiven Klonen, die das erwünschte DNA-Konstrukt enthielten, wurden 3 ml Ampicillin-haltiges Flüssigmedium mit einzelnen Kolonien inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Bakterienkulturen wurden im Folgenden aufgeschlossen und zur Analyse der DNA-Konstrukte genutzt.

2.2.9.5 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Minipräparation von Plasmid-DNA hat das gleiche Prinzip wie die Präparation von Plasmid-DNA. Bei der Minipräparation wird die DNA jedoch nicht durch Silikagelsäulen gereinigt, was dazu führt, dass die gereinigte DNA mehr Ionen und Verunreinigungen als die anderen DNA-Präparationen enthält und hauptsächlich zur Restriktionsanalyse von Klonen oder Klonierungen verwendet wird.

1,5 ml Bakteriensuspension wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert, für 5 min bei RT bei 8000 U/min (Biofuge 13, Heraeus) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl Flexi-Präp-Lösung I durch Vortexen resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Flexi-Präp-Lösung II wurde der Ansatz invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden 200 µl Flexi-Präp-Lösung III dem Ansatz hinzugefügt. Der Ansatz wurde invertiert, für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend für 5 min bei RT und 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol überführt, der Ansatz wurde invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde für 7 min

bei RT und bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment an der Luft für etwa 30 min getrocknet und die gewonnene DNA in 30-50 µl dH₂O gelöst.

Flexi-Präp-Lösung I:	10 ml Tris-Base (1 M; pH 7,5) 2 ml EDTA (0,5 M) 2 ml RNase A (10 mg/ml) ad 100 ml dH ₂ O
Flexi-Präp-Lösung II:	10 ml NaOH (2 M) 2 ml Natriumdodecylsulfat (20%) ad 100 ml dH ₂ O
Flexi-Präp-Lösung III:	29,44 g Kaliumacetat 11,3 ml Essigsäure (99%) ad 100 ml dH ₂ O

Da die Ligation mit den kohäsiven Enden nach *SalI*- und *XhoI*-Verdau durchgeführt wurde, konnte die Ligationsstelle nicht mehr durch Restriktionsspaltung geöffnet werden. Zur Analyse des pAcGHLT-C[RasGRP3]-Konstrukts wurden daher die Enzyme *NdeI* und *NotI* eingesetzt. Die *NdeI*-Erkennungssequenz ist 5 bp stromaufwärts von der ursprünglichen *XhoI*-Stelle in pAcGHLT-C lokalisiert (Abb. 6). Der Restriktionsverdau erfolgte wie oben beschrieben; jedoch wurden 0,5 µl *NdeI* statt *XhoI* bzw. *SalI* und 38 µl dH₂O eingesetzt. Positive DNA-Klone zeigten ein Vektorfragment der Größe 8717 bp und ein Insert-Fragment mit einer Länge von 2080 bp (Abb. 19 im Kapitel „Ergebnisse“).

Zur Überprüfung der RasGRP3-Sequenz wurde ein nach Restriktionsanalyse positives Konstrukt zur Sequenzierung geschickt (Fa. gatc Biotech, Konstanz) und die Sequenz des offenen Leserahmens verifiziert. Für die weiteren Arbeitsschritte wurde ein korrekter Klon im größeren Maßstab amplifiziert (Plasmid Midi Kit, Qiagen).

2.2.9.6 Rekombination von Transfervektor-DNA / BaculoGold-Virus-DNA

(Felgner *et al.*, 1987; Kitts & Possee, 1993)

Zur Rekombination des Transfervektors pAcGHLT-C[RasGRP3] mit der Sequenz von RasGRP3 und der BaculoGold-DNA, die für den größten Teil der Baculovirus-Sequenz kodiert, wurden beide Konstrukte mittels Kotransfektion in Insektenzellen eingeschleust. Nach erfolgreicher Kotransfektion konnten beide DNA-Spezies durch entsprechende

homologe Bereiche *in vivo* homolog rekombinieren und somit beide Sequenzen zu einem Vektor fusionieren.

Sf9-Zellen wurden auf 60-mm-Zellkulturschalen umgesetzt, in TNM-FH-Medium (*plus* FKS und Penicillin/Streptomycin) bei 27°C für 3-4 h solange kultiviert, bis alle Zellen am Boden anhafteten. Dann wurden 100 µl TNM-FH-Medium (ohne FKS und Penicillin/Streptomycin) und 10 µl Lipofectamin (1 mg/ml) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, für 10 s durch Vortexen gemischt und für 45 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden in einem zweiten Reaktionsgefäß 2,5 µl BaculoGold-DNA (entspricht 0,25 µg) und 1 µl (entspricht 1 µg) pAcGHLT-C mit Insert in 100 µl TNM-FH-Medium (ohne FKS und Penicillin/Streptomycin) gelöst und komplett in das erste Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei RT. In der Zwischenzeit wurde der Überstand von den abgesetzten Sf9-Zellen entfernt. Die Zellen wurden mit 2 ml TNM-FH-Medium (ohne FKS und Penicillin/Streptomycin) gewaschen. 1 ml TNM-FH-Medium (ohne FKS und Penicillin/Streptomycin) gefolgt von dem Transfizierungsansatz und weiteren 1 ml Medium wurden auf die Zellen gegeben und die Zellkulturschale kurz geschwenkt. Die Inkubation der Zellen erfolgte über Nacht bei 27°C. Nach etwa 20 h wurde der liposomenhaltige Überstand abgenommen, der Zellrasen mit 2 ml TNM-FH-Medium (*plus* FKS und Penicillin/Streptomycin) gewaschen und mit 5 ml des gleichen Mediums weiter kultiviert. Um eine möglichst hohe Transfektionseffizienz und somit einen möglichst hohen Virustiter zu erreichen, dauerte die Inkubation 3-6 Tage.

2.2.9.7 Virusernte

Nach der Kotransfektion von Sf9-Zellen mit den Baculovirus-Vektoren entstand das rekombinante Virus BaV-GST-RasGRP3. Der größte Teil der Baculoviren befand sich im Zellkulturmedium. Um die Viren präparieren zu können, wurden Zellen und Zelltrümmer aus dem Medium entfernt und die erhaltene Virussuspension für Infektionsexperimente eingesetzt. Bei den infizierten Sf9-Zellen wurde der Zellkulturüberstand steril abgenommen, in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei RT und 2000 U/min zentrifugiert. Der virushaltige Überstand konnte in einem neuen Röhrchen bei 4°C gelagert werden.

2.2.9.8 Passagierung (Infektionen und Virusernten)

Um den Virustiter für spätere Anwendungen zu erhöhen, wurden die Baculoviren passagiert, d. h. es wurden Sf9-Zellen mit dem vorher geernteten Baculovirus infiziert und

der von diesen Zellen amplifizierte Virus geerntet. Die Infektion der Sf9-Zellen lief wie folgt ab: Bei den mit TNM-FH-Medium (*plus* FKS und Penicillin/Streptomycin) auf 145-mm-Zellkulturschalen kultivierten Zellen wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden mit 12,5 ml Medium gewaschen (bei allen Waschschritten wurde TNM-FH-Medium ohne FKS und ohne Penicillin/Streptomycin) eingesetzt. Dann wurde die aus der ersten Ernte gewonnene Baculovirussuspension mit TNM-FH-Medium (ohne FKS und Penicillin/Streptomycin) auf 5 ml aufgefüllt und dieser Ansatz auf den konfluenten Zellrasen gegeben. Die Zellen wurden für 2 h bei 27°C inkubiert. In dieser Zeit konnten die Viren an den Zellen adsorbieren. Danach wurde das Zellkulturmedium mit 20 ml TNM-FH-Medium (*plus* FKS und Penicillin/Streptomycin) aufgefüllt und für 3-6 Tage inkubiert. Die anschließende Virusernte fand wie oben beschrieben statt. Durch mehrere dieser Infektions-Zyklen konnte der Virustiter deutlich erhöht und eine Plaquereinigung durchgeführt werden.

2.2.9.9 Plaquereinigung

Bei der Plaquereinigung von Baculoviren wurden Sf9-Zellen infiziert und mit Agarose überschichtet, um die Diffusion der freien Virionen im Medium zu verhindern. Da von infizierten Zellen ausgehend nur benachbarte Zellen infiziert werden können, entstehen nach der Lyse der virusbefallenen Zellen Löcher im Zellrasen (Plaques), die nach Färbung sichtbar gemacht und aus denen Viren isoliert werden. Die Virionen in diesen Plaques stellen Nachkommen eines einzigen Virions dar (Klone) und sind somit genetisch identisch. Die Plaquereinigung ist notwendig, um eine stabile und bezüglich der Genomsequenz korrekte Viruspopulation zu erhalten.

Sf9-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80%-90% inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 1 ml Medium (*plus* FKS und Penicillin/Streptomycin) wurden die Zellen mit 1 ml Virussuspension infiziert und für 1 h bei 27°C inkubiert. Für die Agaroseüberschichtung wurde ein Agarosemedium hergestellt, bestehend aus 2 Volumina TNM-FH-Medium (*plus* FKS und Penicillin/Streptomycin), 1 Volumen steriles dH₂O und 1 Volumen 4%-ige Agaroselösung. Bei jedem Loch der 6-Well-Platte wurde zunächst das Medium von den Zellen entfernt und dann wurden pro Bohrung 2 ml etwa 40°C warmen Agarosemediums auf die Zellen gegeben. Innerhalb von etwa 20 min bei RT wurde das Medium fest und die Zellen wurden für 5-7 Tage bei 27°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde der Agaroseüberzug mit 500 µl Neutralrotlösung (0,33 g/l in PBS-Puffer) überschichtet. Nach einstündiger Inkubation bei 27°C wurde die Farbstofflösung vorsichtig abgenommen und die Platten umgedreht über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen erschienen die zum Zeitpunkt der Färbung noch vitalen Zellen intensiv rot

bis violett, während die toten bzw. lysierten Zellen in den Plaques nur schwach gefärbt waren. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde in einen solchen Plaque gepickt und die virushaltige Agarose in ein 15 ml-Röhrchen überführt, das 1 ml TNM-FH-Medium (*plus* FKS und Penicillin/Streptomycin) enthielt. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert und die Virionen aus der Agarose gewaschen. Aus der aus der Agarose gewonnenen Virussuspension wurden durch Infektion von neuen Sf9-Zellen erneut Viruskclone passagiert und eine hochtitrige Virussuspension hergestellt.

2.2.9.10 PEG-Fällung von Virionen

(Stope *et al.*, 2001)

Um sicherzustellen, dass die plaquegereinigten Viren die Sequenz von RasGRP3 im Genom tragen, wurden Virionen angereichert und der entsprechende Genomabschnitt durch PCR amplifiziert und das PCR-Produkt sequenziert.

Die Virionen wurden durch Polyethylenglykol (PEG) aus zellfreier Virussuspension gefällt. Dazu wurde die aus der letzten Passagierung erhaltene Virussuspension verwendet. Zu der Suspension wurden im Verhältnis 9:1 eine 50%-ige PEG-Lösung hinzugefügt, so dass die Endkonzentration an PEG 5% betrug. Der Ansatz wurde vorsichtig vermischt, für 1,5 h auf Eis inkubiert und anschließend für 30 min bei 4°C und 6000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 200 µl NTE-Puffer resuspendiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Aus diesen angereicherten Virionen wurde die genomische Virus-DNA mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) nach dem *Blood and Body Fluid Spin Protocol* präpariert.

NTE-Puffer: 25 ml Tris-Base (1 M; pH 7,4)
 15 ml NaCl (5 M)
 1 ml EDTA (0,5 M; pH 8,0)
 ad 500 ml dH₂O

Die präparierte Virus-DNA wurde mittels PCR amplifiziert. Dies geschah unter Verwendung des *Taq-PCR Master Mix* (Qiagen) nach dem *PCR Protocol Using Taq-PCR Master Mix*. Das hierfür verwendete Bacu-Primerpaar hybridisierte in der Baculovirus-Sequenz stromaufwärts und stromabwärts der inserierten RasGRP3-Sequenz, womit eine Amplifizierung zellulärer DNA-Kontaminationen vermieden wurde. Die Oligonukleotide hatten folgende Sequenzen: vorwärts: 5'-ctgactcatgttgatgacgc-3' (Bacu-2657); rückwärts: 5'-agcagatgcggtacagatctc-3' (Bacu-3039). Die genaue Durchführung der PCR erfolgte wie folgt:

PCR-Ansatz:

- 50,0 µl *Taq*-PCR Master Mix
- 45,9 µl dest. H₂O
- 2,0 µl Bacu-Primer Bacu-2657
- 2,0 µl Bacu-Primer Bacu-3039
- 2,0 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,1 µl DNA-Präparation

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Tpersonal, Biorad) mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

1)	95°C	3'
2)	94°C	15''
3)	60 °C	30''
4)	72°C	3'
5)	72°C	5'
6)	4°C	∞

Die Temperaturschritte 2 bis 4 wurden 30-Mal wiederholt. Als Negativkontrolle diente eine PCR ohne DNA-Probe, als Positivkontrolle eine PCR mit 2 µl des Ursprungsplasmids pAcGHLT-C[RasGRP3]. Die berechnete Länge des PCR-Produktes mit einem korrekten Insert betrug 2485 bp. Die Identität des PCR-Produkts wurde durch Sequenzierung bestätigt (Fa. gatac Biotech, Konstanz).

2.2.9.11 Virustitration

Neben der PCR-Prüfung (vermehrte Virionen enthalten die heterologe RasGRP3-Sequenz) wurden auch Virustitrationen zur Bestimmung der Anzahl infektiöser Virionen in der Suspension durchgeführt. Somit konnte der Klon mit der besten Replikationsrate ausgewählt und für folgende Infektionsexperimente eingesetzt werden.

Bei der Virustitration wurden verschiedene Verdünnungen der Virussuspension eines Viruskons in TNM-FH-Medium (ohne FKS und Penicillin/Streptomycin) zur Infektion der Sf9-Zellen eingesetzt. Der Verdünnungsfaktor variierte von 1:10 bis 1:10⁹.

Sf9-Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80%-90% kultiviert. Die Zellen wurden mit 1 ml Medium gewaschen, dann mit 1 ml Virussuspension infiziert und für 2 h bei 27°C inkubiert. Wie bei der Plaquereinigung beschrieben wurden die infizierten Sf9-Zellen mit Agarose überschichtet und für 5-7 Tage inkubiert. Dann wurden die

vitalen bzw. nicht nach Virusinfektion lysierten Zellen mit Neutralrotlösung angefärbt und die *plaques forming units* (pfu) gezählt.

Der Virustiter konnte dann aus der Verdünnung, der Plaqueanzahl und der Menge der zugegebenen Virussuspension berechnet werden und gab somit die Zahl der infektiösen Virionen in der Suspension an (Abb. 7). Zur weiteren Bearbeitung wurde der Klon 3 ausgewählt, da dieser den höchsten Titer aufwies.

	BaV-RasGRP3 Klone		
	1	2	3
10^0	+	+	+
10^{-1}	+	+	+
10^{-2}	+	+	+
10^{-3}	+	+	+
10^{-4}	+	+	+
10^{-5}	+	+	+
10^{-6}	43	49	63
10^{-7}	2	4	8
10^{-8}	-	-	-
10^{-9}	-	-	-
Titer [pfu/ml]	$4,3 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$	$6,3 \times 10^7$

Abbildung 7. Titration von drei verschiedenen BaV-RasGRP3-Virusklonen. „+“ bedeutet, dass viele, aber nicht ausgezählte Plaques sichtbar waren; „-“ bedeutet, dass keine Plaques sichtbar waren. pfu, *plaque forming unit*.

2.2.9.12 Affinitätsreinigung von GST-getaggtten Fusionsproteinen

Das rekombinante Baculovirus mit der Sequenzinsertion für das heterologe Protein RasGRP3 kann genutzt werden, um dieses Protein in Sf9-Zellen zu exprimieren. Stromaufwärts der Insertion befindet sich im Vektor pAcGHLT-C die Sequenz für die Glutathion-S-Transferase (GST), so dass durch Expression ein Fusionsprotein GST-RasGRP3 synthetisiert wird (Abb. 8). Der GST-Anteil des Proteins lässt sich zur Reinigung des Fusionsproteins nutzen, indem der GST-Rest spezifisch an immobilisiertes Glutathion gebunden wird. Nach dieser Bindung können Begleitproteine und niedermolekulare Substanzen effektiv entfernt werden. Im Gegensatz zu der bakteriellen Herstellung des GST-RaIGDS-RBD-Fusionsproteins wird bei der Synthese von GST-RasGRP3-Fusionsprotein in eukaryontischen Sf9-Zellen das Protein posttranslational prozessiert (z. B. Acylierungen,

Glycosylierungen, Phosphorylierungen oder spezifische Spaltungen). Somit entstehen modifizierte Proteine, die den Wildtypproteinen aus Säugetieren stärker ähneln als rekombinante Proteine aus Bakterien.

pAcGHLT-A, -B, -C Baculovirus Transfer Vector Set

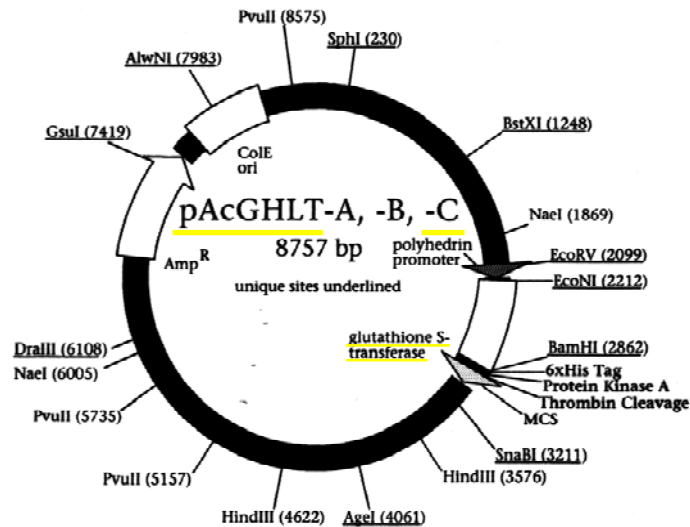


Abbildung 8. Aufbau des Fusionsvektors pAcGHLT-C. Die Abbildung entstammt dem Baculovirus Expression Vector System Manual (Instruction Manual, 6th Edition, May 1999, Pharmingen).

Zunächst wurden die BaV-GST-RasGRP3-infizierten Zellen abgelöst und im Zellkulturüberstand steril resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 min bei RT und 2000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und als neue Virussuspension gelagert. Das Sediment wurde in 50 ml PBS resuspendiert und wie oben aufgeführt zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 40 ml GST-Puffer SF 1 resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden die Sf9-Zellen auf Eis mit sechs 30 s-Zyklen durch Ultraschall aufgeschlossen. Das erhaltene Lysat wurde mit 1% Triton X-100 bei 4°C im Überkopfschüttler für 30 min inkubiert und anschließend für weitere 30 min bei 4°C und 18000 U/min zentrifugiert. Dadurch wurde die zytosolische Fraktion mit den Fusionsproteinen im Überstand von der Membranfraktion im Sediment getrennt. Mit dem abgenommenen Überstand wurde eine Affinitätsreinigung im Affinitätssäulenverfahren durchgeführt.

GST-Puffer SF 1:

- 8,56 g Saccharose
- 5 ml Tris-Base (1 M; pH 7,5)
- 0,8 ml EGTA (250 mM)
- 100 µl DTT (1 M)
- 10 µl Leupeptin (5 mg/ml)
- 1 µl PMSF (1 M in DMSO)
- ad 100 ml dH₂O

Danach wurde 1 ml Glutathion-Sepharose-*Beads* in 9 ml GST-Puffer SF 2 resuspendiert und für 10 min bei 4°C im Überkopfschüttler in der Affinitätssäule (Polyprep Chromatography Columns, Biorad) vermischt. Im nächsten Schritt wurde der Überstand des *Sf9*-Zelllysats auf die Säule gegeben. Nach Durchlauf des Überstandes wurden die *Beads* dreimal mit jeweils 10 ml GST-Puffer SF 1 gewaschen. Das immobilisierte Protein stand für weitere Untersuchungen wie SDS-PAGE und Coomassie-Färbung oder Immunoblot-Verfahren mit einem gegen GST-gerichteten Antikörper zur Verfügung (Abb. 21 im Kapitel „Ergebnisse“). Um den optimalen Zeitpunkt für die Proteinreinigung nach der Virus-Infektion der Zellen zu bestimmen, wurde auch die Expressionskinetik des Fusionsproteins in *Sf9*-Zellen untersucht (Abb. 22 im Kapitel „Ergebnisse“).

GST-Puffer SF 2:

- 5 ml Tris-Base (1 M; pH 7,5)
- 0,8 ml EGTA (250 mM)
- 100 µl DTT (1 M)
- ad 100 ml dH₂O

2.2.10 Proteinbestimmungen

2.2.10.1 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Zur Bestimmung des Proteingehaltes von verschiedenen Proben wurden die Proben der Versuche in Küvetten pipettiert (Sarstedt), mit dH₂O auf ein Volumen von 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt. Das Bradford-Reagenz enthält den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue R250, bei dem sich nach Bindung an Proteine das Absorptionsmaximum der Farbe verschiebt (von 465 nm ohne Protein zu 595 nm mit Protein). Um die Proteinkonzentration der Proben berechnen zu können, wurde zuvor eine Standardreihe aus Rinder-γ-Globulin erstellt. Nach Mischen und 10-minütiger Inkubation bei

RT wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen (Spektrometer LKB Biochrom Ultrospec II, Pharmacia).

Bradford-Reagenz: 350 mg Coomassie-Blau G (Serva)
 250 ml Ethanol
 250 ml Phosphorsäure (85%)
 ad 1 l dH₂O

2.2.10.2 BCA-Proteinbestimmung

(Smith *et al.*, 1985)

Da der bei einigen Versuchen benutzte Lyse-Puffer neben 1 M Tris-Base auch 1% SDS enthält und das Detergenz SDS die Färbereaktion bei der Proteinbestimmung nach Bradford stört (Bradford, 1976), wurde in diesen Fällen die Proteinbestimmung mit Bicinchonininsäure (BCA) angewandt. Bei dieser Methode bilden Proteine mit Cu²⁺-Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Die Cu²⁺-Ionen des Komplexes werden zu Cu⁺-Ionen reduziert, die mit Bicinchonininsäure einen violetten Farbkomplex bilden. Gemäß dem Standardprotokoll des BCA Protein Assay Kit (Pierce) wurde die Lichtabsorption bei 562 nm gemessen (Spektrometer LKB Biochrom Ultraspec II, Pharmacia). Mit Hilfe der erstellten Standard-Eichreihe konnte die Proteinkonzentration der eingesetzten Proben errechnet werden.

2.2.11 SDS-PAGE, Immunoblot, Immunfluoreszenzmikroskopie

2.2.11.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

Die Untersuchung der Proteinüberexpression in den transfizierten Zellen erfolgte mittels **Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese** (SDS-PAGE) mit anschließender Immunoblotfärbung. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfizierung zweimal mit Phosphat-gepufferter Salzlösung gewaschen (PBS 1x), danach durch Zugabe von kochendem Lyse-Puffer aufgeschlossen und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt) pipettiert. Die Proben wurden für 10 min bei 95°C (Thermoblock, Eppendorf) erhitzt und mit Hilfe einer 20-G-Kanüle resuspendiert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde die BCA-Proteinbestimmung verwendet. Die gewünschten Proteinmengen wurden

dann in ein anderes 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit SDS-Probenpuffer auf 100 µl aufgefüllt und wieder auf 95°C erhitzt.

Bei der Herstellung der Gele wurden Acrylamid und Bisacrylamid in einem Verhältnis von 30:0,8 verwendet, durch die Zugabe von TEMED und APS kam es zur Gelpolymerisation. Bei dem Sammelgel wurde der Anteil an Acrylamid konstant auf 6% (m/v) eingestellt. Dagegen wurde bei dem Trenngel ein Acrylamidgehalt von 5%, 10%, 12,5% oder 15% je nach Molekulargewicht der zu trennenden Proteine eingesetzt. Bei den 5%- und 10%-igen Gelen bestand der HMW-Molekulargewichtsstandard (Sigma) aus Myosin (205 kDa), β-Galaktosidase (116 kDa), Phosphorylase b (97,4 kDa), BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa) und Carboanhydrase (29 kDa), bei höherprozentigen Gelen wies der LMW-Molekulargewichtsstandard (Sigma) eine Zusammensetzung aus BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (36 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Trypsinogen (24 kDa), Sojabohnen-Trypsininhibitoren (20 kDa) und Lactalbumin (14,2 kDa) auf. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben fand in einer mit Elektrophoresepuffer überschichteten Kammer für ungefähr 4 h statt. Die eingestellte Stromstärke betrug konstant 36 mA pro Gel. Bei Kontrollen im Rahmen von Proteinreinigungen wurde die SDS-PAGE im MiniProtean III-System (Biorad) durchgeführt. Dabei wurden die Proben innerhalb von 30 bis 60 min bei einer eingestellten Spannung von 200 V getrennt.

PBS 10x:	160 g NaCl 23 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 4 g KCl 4g KH ₂ PO ₄ ad 2 l dH ₂ O
PBS 1x (pH 7,2):	100 ml PBS 10x 130 mg CaCl ₂ 100 mg MgCl ₂ ad 1 l dH ₂ O
Lyse-Puffer (pH 7,4):	10 mM Tris-Base 1% (m/v) Natriumdodecylsulfat
2× Trenngelpuffer (pH 8,8):	750 mM Tris-Base 0,2% (m/v) Natriumdodecylsulfat

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden über Nacht bei 4°C (100 mA, ~20 V) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem Farbstoff Ponceau S angefärbt. Nachdem die aufgetragenen Proteinstandards mit einem Bleistift markiert worden waren, wurde die Membran mit dH₂O gewaschen und für 1 h in TBS mit 5% (m/v) Magermilchpulver oder Rotiblock (Roth) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde die Membran kurz mit TBS und dH₂O gespült. Im nächsten Schritt wurde die betreffende Primärantikörper-Lösung (Verdünnung in TBS mit 0,1% (m/v) BSA) für wenigstens 1 h zum Blot gegeben. Dabei handelte es sich um Antikörper zum Nachweis von *c-myc*, des EGF-Rezeptors, von GST, HA, Phosphotyrosin, PLC- γ_1 , PLC- ϵ , gebundenem Rap2 und Src. Nach der Inkubationszeit wurde die Antikörperlösung abgekippt und der Blot viermal für 5 min mit TBS (*plus* 0,2% (m/v) Tween 20) gewaschen. Dann fand wieder ein Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit 5% Magermilchpulver oder Rotiblock für 10 min statt. Im Anschluss daran wurde der Blot für 1 h mit der Lösung des entsprechenden sekundären, an Peroxidase gekoppelten Antikörpers (Verdünnungen 1: 5000 bis zu 1: 10000) inkubiert. Diese Lösung wurde erneut abgeschüttet, die Membran dreimal für 5 min mit TBS (*plus* 0,2% (m/v) Tween 20) gewaschen und zum Schluss für 5 min mit TBS gespült. Die anschließende Inkubation mit ECL-Reagenz (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus) erfolgte für 1 min. Bei der Detektion der Chemolumineszenz-Reaktion auf Kodak X-Omat AR-Filmen betrugen die Expositionszeiten zwischen 30 s und 30 min.

55

Blotpuffer:	20% (v/v) Methanol
	0,01% (m/v) Natriumdodecylsulfat
	300 mM Glycin
	40 mM Tris-Base
Ponceau S-Lösung:	5% (v/v) Essigsäure
	0,1% (m/v) Ponceau S

2.2.11.3 Konfokale Immunfluoreszenz-Lasermikroskopie

(Heneweer *et al.*, 2002)

Zur Vorbereitung wurden HEK-293-Zellen mit *c-myc-getaggtter* PLC- ε allein (als Kontrolle) oder zusätzlich jeweils mit S17N Rap1A, S17N Rap2B oder S17N H-Ras (jeweils 100 μ g DNA) transfiziert. Die weitere Kultivierung der Zellen bis zur Versuchsdurchführung erfolgte auf mit Poly-D-Lysin (MG >300 kDa, Konzentration 0,1 mg/ml) beschichteten Deckgläsern. Zunächst wurden die Zellen mit Moscona-Lösung gespült und anschließend für 5 min mit den betreffenden, in Moscona-Lösung verdünnten Agonisten bei 37°C inkubiert. Zur Fixierung und Permeabilisierung wurde eine Ethanol/Aceton-Lösung im Verhältnis 1:1 (v/v) für 10 min bei RT auf die Zellen gegeben. Dann wurden die Zellen zweimal mit Moscona-Lösung gespült und durch Zugabe von Moscona/BSA (0,5%-iges, fettfreies BSA) für 15 min wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Nach dem Blocken wurden die Zellen gespült, für 1 h bei RT mit der primären spezifischen anti-*myc*-Antikörperlösung (Verdünnung von 1:4 in Moscona-Lösung) inkubiert. Daran schloss sich eine dreimalige Spülung mit Moscona/BSA-Lösung an. Im Dunkeln wurden die Zellen für 1 h mit der korrespondierenden sekundären anti-Maus-Antikörperlösung (Alexa-488, Verdünnung von 1:200) inkubiert. Dieser Antikörper ist ein Anti-Maus-Immunglobulin G (leichte und schwere Kette)-Konjugat der Ziege, an Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt und hat ein Absorptionsmaximum bei 495 nm und ein Emissionsmaximum bei 519 nm. Anschließend wurden die Zellen im Dunkeln zweimal mit Moscona/BSA-Lösung und einmal mit dH₂O gewaschen. Die auf den Deckgläsern vorhandenen Zellen wurden mit Hilfe von 90% Glycerol (*plus* 1% p-Phenylendiamin) auf Glasobjektträger fixiert. Mit dem Zeiss LSM 510 Axiovert 100 M Confocal Laser Scanning Microscope System wurde die konfokale Immunfluoreszenz-Lasermikroskopie durchgeführt. Dabei wurden das Plan-Neofluor 40x/1.3 Oil Objektive und die FITC/Rhodamin-Fluoreszenzmikroskopie wie laut Herstellerangaben empfohlen verwendet. Durch Einsatz der Software ImageProPlus (Version 4.5; Media

cybernetics, Inc., Crofton, MD, USA) konnten die Bilder mit einem Gaussfiltermodul entwickelt werden (Adelmann, 1997).

Moscona-Lösung (pH 7,4):	13,6 mM NaCl
	12 mM NaHCO ₃
	10 mM D(+)-Glukose
	4 mM KCl
	0,36 mM NaH ₂ PO ₄
	0,18 mM KH ₂ PO ₄

2.2.12 Datenauswertung

Zur densitometrischen Quantifizierung der Immunoblotbanden wurde die Software ImageQuant (Molecular Dynamics) verwandt. Die abgebildeten Graphiken wurden unter Verwendung des Computerprogramms GraphPadPrism (Version 3.02, 2000) erstellt. Alle Versuche wurden, sofern nicht anderes erwähnt wird, in Dreifachbestimmungen durchgeführt. In den Darstellungen sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen des Mittelwertes von n unabhängigen Versuchen abgebildet. Die Mittelwerte wurden verglichen mit dem (Studentschen) t-Test für paarige Stichproben oder mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (F-Test im Modell der Einfachklassifikation) und ein Unterschied wurde als signifikant angesehen bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 PLC- ϵ -Stimulation nach Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Bisher ist über die Regulation der PLC- ϵ durch Membranrezeptoren nur wenig bekannt. Vor kurzer Zeit konnte unsere Arbeitsgruppe jedoch nachweisen (Schmidt *et al.*, 2001; Evellin *et al.*, 2002), dass an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die PLC- ϵ in HEK-293-Zellen aktivieren können. Dabei bewirkte die Stimulation von typischen G_s -Protein-gekoppelten Rezeptoren (β_2 -Adrenozeptoren, Prostaglandin E_1 -Rezeptoren) die PLC- ϵ -Aktivierung. Diese Aktivierung ist vermutlich auf die Erhöhung des intrazellulären Gehalts an cAMP durch die Stimulation der Adenylycyclase zurückzuführen. Die Stimulation wird entweder durch die Bildung von DAG und IP_3 und die nachfolgende Aktivierung der Proteinkinase C bzw. von Calmodulin vermittelt oder die Aktivierung der Adenylycyclase erfolgt direkt durch das stimulatorisch wirkende G_s -Protein (Peralta *et al.*, 1988). Der *second messenger* cAMP ist nicht nur in der Lage, die Proteinkinase A zu aktivieren, sondern kann auch direkt zur Aktivierung der sog. Epac-Proteine führen (Beavo & Brunton, 2002; Bos, 2003), die spezifische Austauschfaktoren für die Rap-Subfamilie der monomeren GTPasen sind (De Rooij *et al.*, 2000; Quilliam *et al.*, 2002). In der Tat führt Epac1 zur GTP-Beladung von Rap2B und auf diese Weise zur Aktivierung der PLC- ϵ (Harden & Sondek, 2006). Nicht nur die Stimulation von β_2 -Adrenozeptoren und Prostaglandin E_1 -Rezeptoren, sondern auch die Stimulation von muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) führt zur PLC- ϵ -Aktivierung. In diesem Signalweg liegt ebenfalls eine Beteiligung der Signalkomponenten G_{α_s} -Protein, Epac1 und Rap2B vor (Evellin *et al.*, 2002). Bei der Stimulation der PLC-Isoformen in HEK-293-Zellen durch den M_3 -Rezeptor handelt es sich um eine kombinierte Aktion aus der G_{α_q} -vermittelten Stimulation der PLC- β_1 und der durch G_{α_s} und die monomere GTPase Rap2B vermittelten Stimulation der PLC- ϵ (Evellin *et al.*, 2002).

3.2 Einfluss der PLC-Isoformen γ_1 und ϵ auf die PLC-Aktivierung nach EGF-Rezeptor-Stimulation

Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität können neben den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren die PLC- ϵ stimulieren. So wurde vor kurzer Zeit nachgewiesen, dass eine Mutante des PDGF-Rezeptors, die nicht mehr die PLC- γ_1 binden kann, die PLC- ϵ in BaF3-Zellen aktiviert (Song *et al.*, 2002). In diesem Fall soll die PLC- ϵ -Aktivierung *via* Ras und Rap1 erfolgen. Auf Grund der oben genannten Tatsachen und weil bekannt ist, dass der EGF-Rezeptor die PLC- γ_1 aktivieren kann (Rebecchi & Pentyala, 2000; Rhee, 2001; Fukami, 2002; Schmidt *et al.*, 2004), wurde untersucht, ob der EGF-Rezeptor genauso gut wie der M₃-Rezeptor die PLC- ϵ aktivieren kann und ob monomere GTPasen der Ras-Familie und die zu dieser Familie gehörenden Austauschfaktoren eine Rolle spielen.

Zu diesem Zweck wurde insbesondere in HEK-293-Zellen, die sowohl den an die PLC- γ_1 gekoppelten EGF-Rezeptor als auch die PLC- ϵ endogen exprimieren (Stope *et al.*, 2004), die Untersuchung der Effekte von Wildtypen der PLC- γ_1 und der PLC- ϵ sowie deren Lipase-inaktiven Mutanten H335Q PLC- γ_1 und H1144L PLC- ϵ (Lopez *et al.*, 2001) durchgeführt. Die Überexpression von Wildtyp PLC- γ_1 bewirkte, wie von uns erwartet, dass die EGF-Stimulation (100 ng/ml) der HEK-293-Zellen die intrazelluläre IP₃-Bildung deutlich (etwa um den Faktor zwei) verstärkte, während die basalen IP₃-Level nicht signifikant beeinflusst wurden (Abb. 9). Dagegen wiesen HEK-293-Zellen, die die Mutante H335Q PLC- γ_1 exprimierten, nach EGF-Stimulation im Vergleich zu den mit dem leeren Vektor transfizierten, EGF-stimulierten Kontrollzellen einen leicht geringeren IP₃-Gehalt auf. Auch die Überexpression von Wildtyp PLC- ϵ führte nach EGF-Rezeptor-Aktivierung zu einer deutlich verstärkten IP₃-Bildung, ein Effekt, der durch die Expression der Mutante H1144L PLC- ϵ aufgehoben wurde. Bei den Zellen, die die beiden funktionell-inaktiven Mutanten koexprimierten, war der IP₃-Gehalt ebenfalls niedriger als in den EGF-stimulierten Kontrollzellen (Abb. 9).

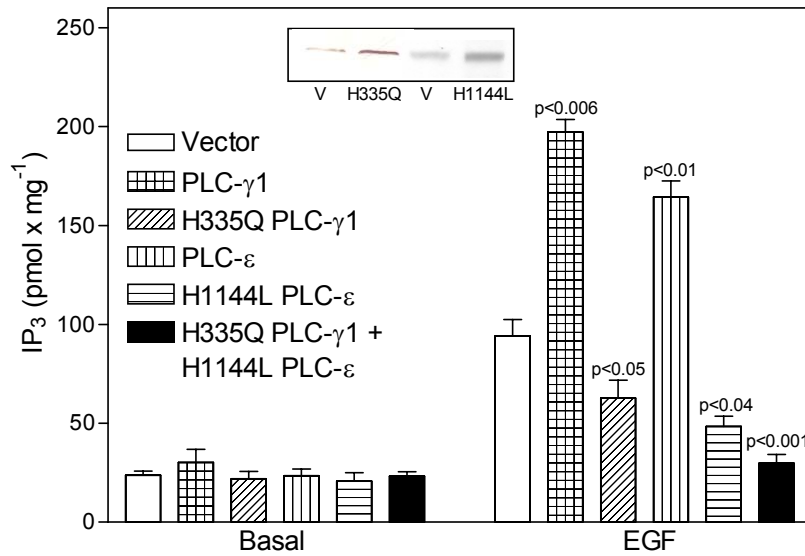


Abbildung 9. Effekte der PLC-γ₁ und der PLC-ε auf die PLC- und IP₃-Signalübertragung in HEK-293-Zellen. HEK-293-Zellen wurden auf 145-mm-Durchmesser-Zellkulturschalen mit dem leeren Vektor (Vektor, V), mit PLC-γ₁, mit PLC-ε, mit den Lipase-inaktiven Mutanten H335Q PLC-γ₁ und H1144L PLC-ε oder mit der Kombination der Lipase-inaktiven Mutanten H335Q PLC-γ₁ und H1144L PLC-ε transfiziert. Die Transfizierung erfolgte mit 100 µg der cDNAs, die für die Lipase-inaktiven PLCs kodieren, und mit 25 µg der cDNAs, die für die Wildtyp-PLCs kodieren. Etwa 48 h nach der Transfizierung wurde die IP₃-Bildung für 1 min bei Abwesenheit (basal) oder bei Anwesenheit von EGF (100 ng/ml) gemessen. Die PLC-Aktivität wurde als IP₃-Bildung in pmol x mg⁻¹ angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte ± die Standardabweichung der Mittelwerte (n=4-5). *Insets*, Nachweis der Expression der Lipase-inaktiven Mutanten H335Q PLC-γ₁ und H1144L PLC-ε.

Bei der Messung der intrazellulären Ca²⁺-Level konnten entsprechende Veränderungen beobachtet werden. Überexpression von Wildtyp PLC-γ₁ erhöhte die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration nach EGF-Stimulation drastisch von 127 ± 15 nM auf 186 ± 23 nM (n=10-12; p<0,0001). Dagegen hatte die Überexpression der Mutante H335Q PLC-γ₁ einen [Ca²⁺]_i-Abfall von 117 ± 16 nM auf 65 ± 15 nM (n=6-8; p<0,001) zur Folge (Abb. 10, linkes Feld). Bei der Verwendung von PLC-ε-Enzymen bei den Überexpressionsexperimenten wurden sehr ähnliche Veränderungen festgestellt. Überexpression von Wildtyp PLC-ε bewirkte einen verstärkten EGF-induzierten [Ca²⁺]_i-Anstieg von 156 ± 26 nM auf 285 ± 21 nM (n=8-10; p<0,0001). Bei Expression der Lipase-inaktiven PLC-ε-Mutante war die EGF-induzierte Erhöhung der [Ca²⁺]_i auf 113 ± 15 nM (n=6-8; p<0,001) abgefallen (Abb. 10, mittleres Feld). Durch die Koexpression

der Lipase-inaktiven Mutanten von PLC- γ_1 und PLC- ϵ wurde der $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg nach EGF-Rezeptor-Stimulation fast vollständig aufgehoben (Abb. 10, rechtes Feld).

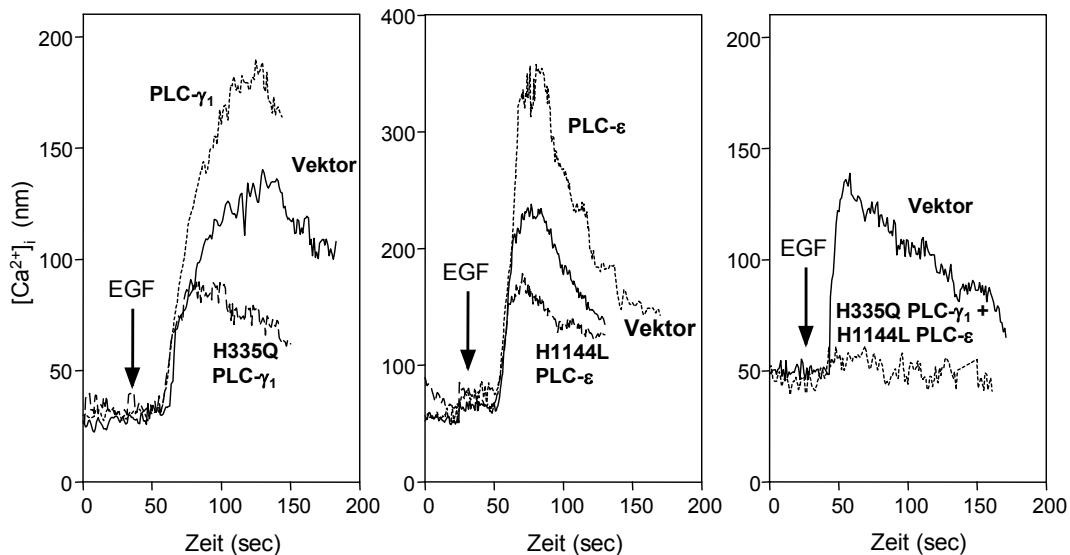


Abbildung 10. Effekte der PLC- γ_1 und der PLC- ϵ auf die EGF-induzierte PLC- und Ca^{2+} -Signalübertragung in HEK-293-Zellen. HEK-293-Zellen wurden auf 145-mm-Durchmesser-Zellkulturschalen mit dem leeren Vektor (Vektor, V), mit PLC- γ_1 , mit PLC- ϵ , mit den Lipase-inaktiven Mutanten H335Q PLC- γ_1 und H1144L PLC- ϵ oder mit der Kombination der Lipase-inaktiven Mutanten H335Q PLC- γ_1 und H1144L PLC- ϵ transfiziert. Die Transfizierung erfolgte mit 100 μ g der cDNAs, die für die Lipase-inaktiven PLCs kodieren, und mit 25 μ g der cDNAs, die für die Wildtyp-PLCs kodieren. Etwa 48 h nach der Transfizierung wurden die EGF-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhungen in mit Fura-2 beladenen Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Verläufe der $[Ca^{2+}]_i$ nach EGF-Stimulation (100 ng/ml) in jeweils einem typischen Experiment. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der EGF-Zugabe an.

Die gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die EGF-Rezeptor-vermittelte Stimulation der PLC-Aktivität in HEK-293-Zellen eine kombinierte Stimulation der PLC- γ_1 - und der PLC- ϵ -Aktivität ist.

3.3 Rap2B-Beteiligung an der EGF-Rezeptor-vermittelten Stimulation und Translokation der PLC- ϵ

Die Aktivität der PLC- ϵ wird durch verschiedene kleine GTPasen der Ras- und Rho-Familien kontrolliert, so kann Ras die PLC- ϵ direkt über die beiden RA-Domänen

der PLC- ϵ binden (Kelley *et al.*, 2001), das Enzym an die Plasmamembran translozieren und aktivieren (Song *et al.*, 2001). Dagegen führt die Assoziation mit Rap1 zur Translokation in die perinukleäre Region (Jin *et al.*, 2001). Die durch die PLC- ϵ katalysierte DAG- und IP₃-Bildung wird in der Anfangsphase hauptsächlich durch Ras-vermittelt, während aktiviertes Rap1 für die anhaltende PLC- ϵ -Aktivierung verantwortlich ist (Song *et al.*, 2002). Auch Rap2A und Rap2B können im GTP-beladenem Zustand mit der PLC- ϵ assoziiert sein (Song *et al.*, 2002), GTP-Rap2B soll jedoch in nur in geringerem Maß zur PLC- ϵ -Aktivierung führen.

Die Verwendung von Clostridium-Toxinen mit unterschiedlichen Empfindlichkeiten für diese GTPasen führte zu dem Ergebnis, dass GTPasen der Ras- und Rap-Familie, aber nicht Rho-GTPasen, am wahrscheinlichsten in die EGF-Rezeptor-Aktion involviert sind (Stope *et al.*, 2004). Um herauszufinden, welche spezifische Ras-verwandte GTPase als Toxinsubstrat dient und somit an der EGF-Rezeptor-Signalübertragung beteiligt ist, wurden die Effekte von verschiedenen dominant-negativen Mutanten monomerer GTPasen auf den [Ca²⁺]_i-Anstieg und die Zunahme der IP₃-Bildung nach EGF-Rezeptor-Stimulation untersucht. Expressionsexperimente unserer Arbeitsgruppe hatten ergeben, dass Rap2B bei der PLC- ϵ -Aktivierung durch den EGF-Rezeptor eine wichtige Rolle spielt, weil eine funktionell-inaktive Rap2B-Mutante den EGF-induzierten [Ca²⁺]_i-Anstieg und die Zunahme der IP₃-Bildung signifikant senkt (Stope *et al.*, 2004). Dagegen scheinen weder Ras noch Rap1 in die PLC-Stimulation nach EGF-Rezeptor-Stimulation eingebunden zu sein.

Es ist bekannt, dass EGF in COS-7-Zellen die Translokation der PLC- ϵ an die Plasmamembran induziert und dass Rap1A die Translokation der PLC- ϵ in perinukleäre Kompartimente, insbesondere des Golgi-Apparats, induziert (Jin *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2001). Deshalb wurde untersucht, ob die subzelluläre Verteilung der PLC- ϵ in HEK-293-Zellen genauso durch EGF verändert werden kann und ob Rap2B über die vorherige Aktivierung der PLC- γ_1 durch den EGF-Rezeptor an diesem Prozess beteiligt ist. Um diese Frage zu beantworten, wurde in HEK-293-Zellen, die die *c-myc-getaggte* PLC- ϵ exprimieren, die vermutete EGF-induzierte Translokation der PLC- ϵ an die Plasmamembran durch die konfokale Immunfluoreszenz-Lasermikroskopie näher betrachtet. Unsere Arbeitsgruppe hatte in früheren Experimenten zeigen können, dass die EGF-Rezeptor-Stimulation die Translokation der PLC- ϵ an die Plasmamembran bewirkt und dass dieser Effekt durch die Expression der konstitutiv-aktiven Mutante G12V-Rap2B nachgeahmt wurde (Stope *et al.*, 2004). Die Koexpression von *c-myc-*

getaggter PLC- ϵ und von dominant-negativem S17N Rap2B verhinderte die EGF-induzierte subzelluläre PLC- ϵ -Umverteilung (Abb. 11). Dagegen hatte die Koexpression der dominant-negativen Mutante S17N Ras überraschenderweise keinen Einfluss auf das Translokationsverhalten (Abb. 11). Die PLC- ϵ war in unstimulierten HEK-293-Zellen genauso wie in den Zellen, in denen nur die PLC- ϵ überexprimiert wurde, nahezu homogen im Zytoplasma verteilt. Wurden diejenigen Zellen, die dominant-negatives S17N Ras exprimierten, mit EGF stimuliert, ergab sich kein signifikanter Unterschied im Translokationsverhalten zu den Kontrollzellen. Auch die Koexpression einer anderen dominant-negativen Mutante der gleichen Familie der monomeren GTPasen, nämlich von S17N Rap1A, war im Gegensatz zu unseren Erwartungen nicht in der Lage, das geschilderte Translokationsverhalten zu beeinflussen.

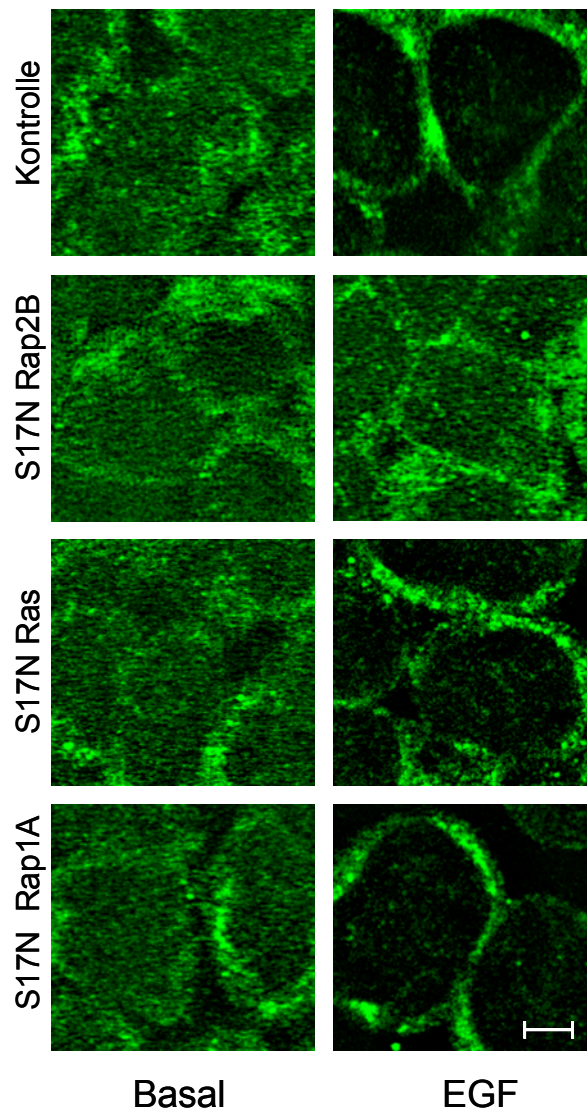


Abbildung 11. Einfluss verschiedener Mutanten auf das Translokationsverhalten der PLC- ϵ . HEK-293-Zellen wurden mit der *c-myc-getaggten* PLC- ϵ allein (Kontrolle) oder *plus* S17N Rap2B oder *plus* S17N Ras oder *plus* S17N Rap1A (100 μ g von jeder cDNA) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für 5 min ohne (basal) oder mit EGF (100 ng/ml) behandelt, mit dem anti-*c-myc*-Antikörper gefärbt und durch konfokale Immunfluoreszenz-Lasermikroskopie untersucht. Dargestellt werden die repräsentativen Ergebnisse von typischen Experimenten ($n=3-4$). Balken, 10 μ m.

Im Einklang mit Ergebnissen aus Immunpräzipitationsexperimenten unserer Arbeitsgruppe mit anti-Rap2- oder anti-*c-myc*-Antikörpern kommt es nach Stimulation des EGF-Rezeptors zu einer Koimmunpräzipitation von Rap2B und nicht von anderen GTPasen der Ras-Familie wie Ras, Rap1A oder Rap2A mit der PLC- ϵ . Bei dieser Interaktion ist die Phospholipase-Aktivität der PLC- ϵ nicht notwendig, da bei der Durchführung dieser Experimente mit der Lipase-inaktiven Mutante H1144L PLC- ϵ ebenfalls eine Koimmunpräzipitation von Rap2B mit der PLC- ϵ nach EGF-Stimulation stattfindet.

Somit induziert der EGF-Rezeptor nach seiner Stimulation die Aktivierung der PLC- ϵ durch die spezifische Bindung von Rap2B an die PLC- ϵ und die folgende Translokation der Lipase an die Plasmamembran.

3.4 RasGRP3-Beteiligung an der Rap2B- und PLC-Aktivierung nach EGF-Rezeptor-Stimulation

Durch die bisher genannten Ergebnisse wurde die Frage aufgeworfen, ob und ggf. wie die EGF-Rezeptor-Stimulation Rap2B in die aktive Form überführen, d.h. die GTP-Beladung von Rap2B induzieren kann. *Pull down-Assays*, bei denen unter Verwendung des immobilisierten Fusionsprotein GST-RaIGDS-RBD nach EGF-Rezeptor-Stimulation GTP-beladenes Rap2B aus Zelllysaten extrahiert und der Rap2B-Anteil im Immunoblot-Verfahren mit einem spezifischen anti-Rap2-Antikörper (Franke *et al.*, 1997) bestimmt wurde, hatten ergeben, dass EGF eine schnelle, langanhaltende Rap2B-Aktivierung mit einem maximalen Level bei etwa 5 min induziert (Stope *et al.*, 2004).

Es gibt eine Vielzahl von neuen GEFs für GTPasen der Ras-Familie, die diese GTPasen aktivieren können und in den letzten 15 Jahren identifiziert wurden. Zu diesen GEFs gehören z. B. C3G, Ca²⁺/DAG-regulierte GEFs, Epac-GEFs und PDZ-

GEFs (Cullen *et al.*, 2002; Quilliam *et al.*, 2002). Um die Frage zu beantworten, welcher spezifische GEF an der Rap2B-vermittelten Signalübertragung des EGF-Rezeptors an die PLC- ϵ beteiligt ist, wurden verschiedene GEFs zu einem vergleichbaren Level in HEK-293-Zellen exprimiert (Abb. 12).

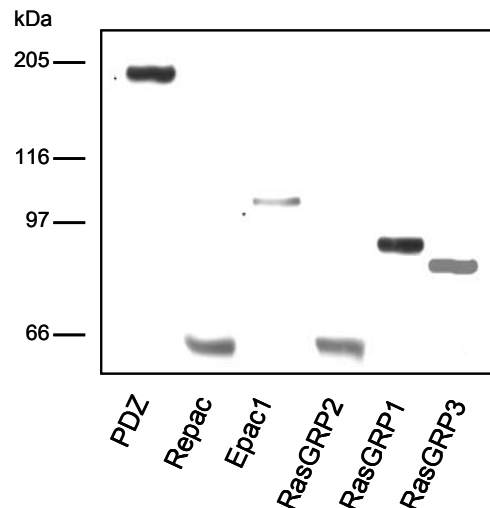


Abbildung 12. Nachweis der Expression von verschiedenen GEFs für Ras-ähnliche GTPasen. HEK-293-Zellen wurden mit Epac1, mit PDZ, mit Repac, mit RasGRP1, mit RasGRP2 oder mit RasGRP3 (25 μ g von jeder cDNA) transfiziert. Nachweis der HA-getaggten GEFs in Lysaten der transfizierten Zellen durch das Immunoblot-Verfahren mit einem anti-HA-Antikörper.

Anschließend wurden die Effekte der exprimierten GEFs auf die EGF-induzierte PLC-Stimulation, den folgenden $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg und die Rap2B-Aktivierung untersucht. Die Effekte der verschiedenen GEFs auf die PLC-vermittelte Veränderung der $[Ca^{2+}]_i$ variierten beträchtlich. Nur die Expression von RasGRP3 verstärkte die EGF-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung von 155 ± 25 nM auf 295 ± 29 nM ($n=8-10$; $p<0,0001$). Andere GEFs wie C3G, Epac1, PDZ und RasGRP2 beeinflussten den $[Ca^{2+}]_i$ -Level nach EGF-Rezeptor-Stimulation nicht signifikant (Abb. 13). Bei der Messung der intrazellulären IP_3 -Bildung konnten entsprechende Veränderungen beobachtet werden (Stope *et al.*, 2004). RasGRP3 aktiviert Ha-Ras, R-Ras, Rap1A und Rap2A (Yamashita *et al.*, 2000), besitzt eine signifikante Sequenz-Homologie mit den Ca^{2+} /DAG-regulierten GEFs RasGRP1, RasGRP2 (Rebhun *et al.*, 2000) und RasGRP4 (Reuther *et al.*, 2002) und zeigt die breiteste Substratspezifität unter den bekannten GEFs für die G-Proteine der Ras-Familie.

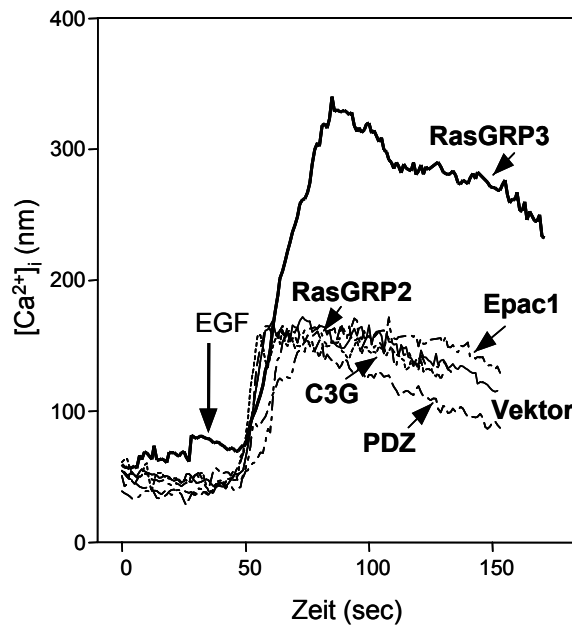


Abbildung 13. Effekte der verschiedenen GEFs für Ras-ähnliche GTPasen auf die EGF-induzierte PLC- und Ca^{2+} -Signalübertragung. HEK-293-Zellen wurden mit einem leeren Vektor (V), mit C3G, mit Epac1, mit PDZ, mit RasGRP2 oder mit RasGRP3 (25 μg von jeder cDNA) transfiziert. Etwa 48 h nach der Transfizierung wurden die EGF-induzierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhungen in mit Fura-2 beladenen Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Verläufe der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach EGF-Stimulation (100 ng/ml) in jeweils einem typischen Experiment. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der EGF-Zugabe an.

Auf Grund der Vermutung, dass der GEF RasGRP3 die PLC-Signalübertragung spezifisch vermitteln könnte, wurde geprüft, ob die verwendeten HEK-293-Zellen dieses Signalprotein endogen exprimieren. RasGRP3-mRNA wird ubiquitär (z. B. in Leber, Skelettmuskel und Plazenta) transkribiert (Rebhun *et al.*, 2000; Lorenzo *et al.*, 2001), konnte aber mittels *in situ*-Hybridisierung hauptsächlich in Oligodendrogliazellen des ZNS, in den glomerulären Mesangiumzellen der Niere (Yamashita *et al.*, 2000) und in endokrinen Geweben (Ozaki *et al.*, 2005) nachgewiesen werden. Ansonsten wird RasGRP3 in (patho-)physiologisch relevanten Mengen in embryonalen Blutgefäßen und in adulten Blutgefäßen während der Schwangerschaft oder der Tumorgenese exprimiert (Roberts *et al.*, 2004). Um die RasGRP3-Expression in HEK-293-Zellen zu überprüfen, wurden mittels Reverser Transkription (RT) und anschließender PCR (RT-PCR) mit RasGRP-spezifischen Primerpaaren die entsprechenden mRNA-Spezies nachgewiesen. Als Kontrollen dienten PCR mit der genomischen DNA. Tatsächlich konnten alle drei RasGRPs sowohl auf genomischer als auch auf mRNA-Ebene

nachgewiesen werden (Abb. 14). Die korrespondierenden genomischen Amplicons (amplifizierte DNA-Abschnitte) von RasGRP1, RasGRP2 und RasGRP3 besitzen eine berechnete Größe von 1004, 416 und 515 Basenpaaren, die kalkulierten Größen der amplifizierten Transkripte von RasGRP1, RasGRP2 und RasGRP3 betragen 153, 212 und 206 Basenpaare.

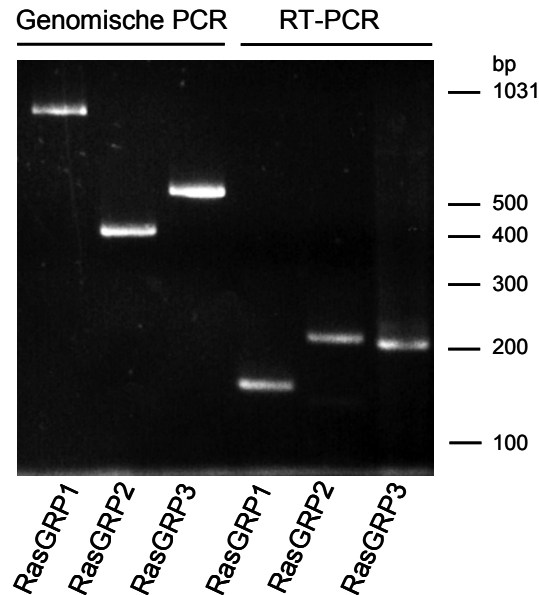


Abbildung 14. Nachweis von verschiedenen RasGRPs. DNA und mRNA von RasGRPs wurden in HEK-293-Zellen entweder durch die PCR oder durch RT-PCR nachgewiesen.

Die benötigten Sequenzinformationen wurden aus der GenBank-Datenbank bezogen, die Zugangsnummern lauten NT_010194, NT_33903 und NT_022184. Diese genetischen Untersuchungen ergaben, dass die HEK-293-Zellen nicht nur spezifisch für RasGRP1 und RasGRP2 kodierende mRNA-Transkripte exprimieren, sondern auch die Transkription der mRNA für RasGRP3 stattfindet (Abb. 14).

Um den Einfluss auf die Rap2B-Aktivierung und die Rolle von GEFs bei diesem Vorgang näher zu untersuchen, wurden verschiedene GEFs in HEK-293-Zellen exprimiert und nach EGF-Stimulation wurde GTP-beladenes Rap2B aus Zelllysaten mit immobilisiertem RaIGDS-RBD extrahiert. Der EGF-Effekt auf die Rap2B-Aktivierung wurde durch die Expression der verschiedenen GEFs C3G, Epac1, PDZ, RasGRP1 oder RasGRP2 nicht verändert (Stope *et al.*, 2004).

Lediglich die Aktivierung von H-Ras und Rap1A nach EGF-Rezeptor-Stimulation wurden durch die Expression von C3G, PDZ, Repac, RasGRP1 oder RasGRP2 verstärkt. Dagegen wies die deutliche Verstärkung der Rap2B-Aktivierung nach EGF-Rezeptor-Stimulation durch die zusätzliche Expression von RasGRP3 auf einen

bedeutenden Einfluss dieses GEF hin (Stope *et al.*, 2004). RasGRP3, das zur Familie der Ca^{2+} /DAG-regulierten GEFs gehört sowie die GTP-Beladung von Mitgliedern der Ras- und Rap-Subfamilien (z. B. Ha-Ras und Rap1) *in vitro* und *in vivo* induziert (Rebhun *et al.*, 2000; Yamashita *et al.*, 2000), hat anscheinend einen spezifischen Einfluss auf die EGF-Rezeptor-vermittelte Rap2B-Aktivierung und die anschließende PLC- ϵ -Stimulation.

Spezifische Hemmstoffe der herkömmlichen Proteinkinase C-Isoformen wie das Indolocarbazol Gö6976 (Brose *et al.*, 2002) konnten die EGF-induzierte Rap2B-Aktivierung nicht beeinflussen (Stope *et al.*, 2004). Dagegen war es möglich, entweder durch Chelatbildung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen mit BAPTA/AM oder durch Expression einer Lipase-inaktiven Mutante der PLC- γ_1 , wie H335Q PLC- γ_1 , die durch EGF ausgelöste GTP-Beladung von Rap2B deutlich zu erniedrigen (Stope *et al.*, 2004). Die GEF-Aktivität von RasGRP3 wird durch die Anwesenheit der *second messenger* Ca^{2+} und DAG kontrolliert (Quilliam *et al.*, 2002), die von der Phospholipase C freigesetzt werden und zumindest teilweise unabhängig von der Proteinkinase C an der Signalübertragung beteiligt sind (Lorenzo *et al.*, 2001; Brose *et al.*, 2002; Cullen *et al.*, 2002).

3.5 Mechanismen der RasGRP3-vermittelten PLC- ϵ -Aktivierung nach EGF-Rezeptor-Stimulation

Wie in der Einleitung erwähnt, aktiviert der EGF-Rezeptor die PLC- γ_1 durch Rekrutierung der Lipase an autophosphorylierte Tyrosinreste des Rezeptors und anschließende Tyrosinphosphorylierung (Rebecchi & Pentyala, 2000; Schlessinger, 2000; Rhee, 2001; Fukami, 2002).

Bisherige Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten belegen, dass bei der PLC-Aktivierung nach Stimulation des endogen in HEK-293-Zellen exprimierten EGF-Rezeptors die monomere GTPase Rap2B eine wichtige Rolle spielt und dass die PLC- ϵ -Aktivierung nach EGF-Rezeptor-Stimulation anscheinend durch RasGRP3 vermittelt wird. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die EGF-Stimulation der HEK-293-Zellen zu einer Tyrosinphosphorylierung dieses GEF führen kann. Dazu wurde HA-*getaggt*es RasGRP3 in diesen Zellen exprimiert, eine Immunpräzipitation durchgeführt und es wurden Tyrosinphosphorylierungen mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper nachgewiesen. Diese Untersuchung hat ergeben, dass es nach Stimulation des EGF-Rezeptors tatsächlich zur Tyrosinphosphorylierung von RasGRP3 kommt (Abb. 15,

oberes Feld). Hingegen wurde RasGRP1 nach EGF-Stimulation nicht an Tyrosinresten phosphoryliert. Dagegen verhinderte die Zugabe des EGF-Rezeptor-Inhibitors AG1478 (10 μ M) die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung von RasGRP3 (Abb. 15, unteres Feld).

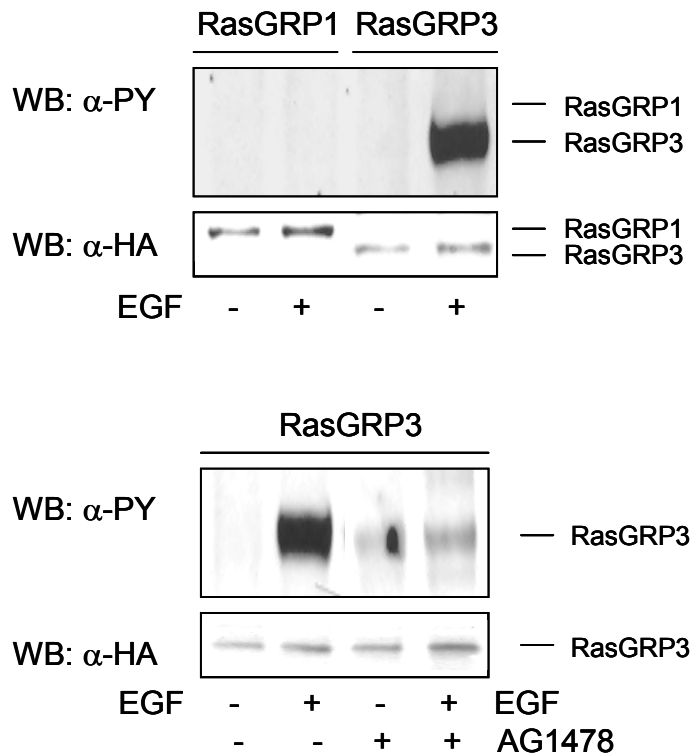


Abbildung 15. EGF-Rezeptor-vermittelte Tyrosinphosphorylierung von RasGRP3. HEK-293-Zellen wurden mit HA-getaggetem RasGRP1 oder RasGRP3 (25 μ g von jeder cDNA) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für 30 min ohne (-) oder mit (+) 10 μ M AG1478 inkubiert und dann für 5 min ohne (-) oder mit (+) 100 ng EGF/ml wie gezeigt stimuliert. Nach der Zellyse wurden die HA-getaggeten RasGRPs immunpräzipitiert, durch die SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-Phosphotyrosin (α -PY)-Antikörpern untersucht. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis eines typischen Experiments ($n=3-5$). WB, Western Blot.

Weil somit nachgewiesen wurde, dass es nach Stimulation des EGF-Rezeptors zur Tyrosinphosphorylierung von RasGRP3 kommt, wurden die Interaktionen zwischen dem EGF-Rezeptor und RasGRP3 näher betrachtet. Zu diesem Zweck wurde der Versuch unternommen, eine Koimmunpräzipitation des EGF-Rezeptors mit HA-getaggetem und in HEK-293-Zellen exprimierten RasGRP3 zu erreichen. Dabei sollte der koimmunpräzipitierte EGF-Rezeptor im Immunoblot-Verfahren mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper gegen ein C-terminales Peptid des EGF-Rezeptors nachgewiesen werden. Weil der Nachweis dieser Koimmunpräzipitation

nicht möglich war, lag die Vermutung nahe, dass ein zusätzliches Signalprotein (insbesondere eine Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinase) die Interaktion zwischen dem aktivierten EGF-Rezeptor und RasGRP3 vermittelt bzw. zur Phosphorylierung von RasGRP3 führt. Wie in der Einleitung beschrieben, kann der EGF-Rezeptor die zytosolische Tyrosinkinase c-Src aktivieren (Rhee, 2001). Also wurde untersucht, ob c-Src für die Phosphorylierung von RasGRP3 verantwortlich ist. Dazu wurden HEK-293-Zellen entweder mit dem c-Src-Hemmstoff PP₂ (10 µM) behandelt oder in diesen Zellen Kinase-defiziente Mutanten verschiedener zytoplasmatischer Tyrosinkinasen exprimiert. Die Expression der beiden Mutanten K298M c-Src und K457A Pyk₂ wurde durch Immunoblot-Experimente mit spezifischen Antikörpern bestätigt (Daten hier nicht gezeigt). Die PP₂-Behandlung der Zellen hob die Tyrosinphosphorylierung von RasGRP3 komplett auf (Abb. 16, oberes Feld). Die Expression der Kinase-defizienten Mutante K298M c-Src führte zu einem ähnlichen Effekt (Abb. 16, mittleres Feld). Im Gegensatz dazu ließ die Expression von Kinase-defizientem K457A Pyk₂ die Tyrosinphosphorylierung von RasGRP3 unverändert (Abb. 16, unteres Feld).

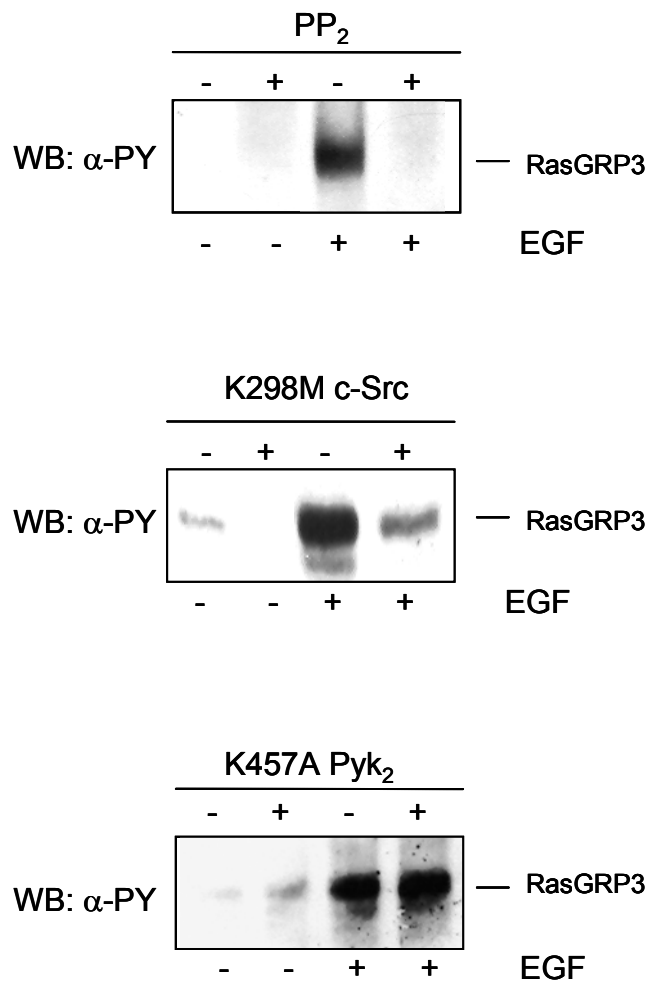


Abbildung 16. EGF-Rezeptor-vermittelte Tyrosinphosphorylierung von RasGRP3 durch c-Src. HEK-293-Zellen wurden mit RasGRP3 (25 µg DNA) allein oder *plus* die Kinase-defiziente Mutante K298M c-Src oder *plus* die ebenfalls Kinase-defiziente Mutante K457A Pyk₂ (75 µg von jeder DNA) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen für 30 min ohne (-) oder mit (+) 10 µM PP₂ inkubiert und dann für 5 min ohne (-) oder mit (+) 100 ng EGF/ml wie angezeigt stimuliert. Nach der Zellyse wurden die HA-getaggten RasGRPs immunpräzipitiert, durch die SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem anti-Phosphotyrosin (α-PY)-Antikörper untersucht. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis eines typischen Experiments (*n*=3-5). WB, Western Blot.

Die Ergebnisse der bisher stattgefundenen Experimente weisen darauf hin, dass in HEK-293-Zellen die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung von RasGRP3 durch c-Src vermittelt wird. *In vivo*-Experimente mit Tyrosinkinase-Hemmstoffen, die entweder die Kinase-Aktivität des EGF-Rezeptors (wie AG1478) oder der zytoplasmatischen Kinase c-Src (wie PP₂) blockierten, lieferten das Ergebnis, dass die EGF-induzierte

Rap2B-Aktivierung von einer ausreichenden Tyrosinkinase-Aktivität abhängig ist (Stope *et al.*, 2004). Auch die durch das Ca^{2+} -Ionophor A23187 ausgelöste GTP-Beladung von Rap2B konnte durch den c-Src-Hemmstoff PP_2 stark vermindert werden (Stope *et al.*, 2004). In gleichem Maße konnte die Expression einer Kinase-defizienten Mutante von c-Src (K298M c-Src), nicht aber von anderen zytoplasmatischen Tyrosinkinasen wie Pyk₂, die EGF-Rezeptor-vermittelte Rap2B-Aktivierung verringern (Stope *et al.*, 2004). Diese *Pull down*-Assays weisen darauf hin, dass es nach der Stimulation des EGF-Rezeptors zur Tyrosinphosphorylierung von RasGRP3 durch c-Src kommt und dass dieser an einem Tyrosinrest phosphorylierte GEF die Rap2B-Aktivierung triggert.

Somit stellte sich die Frage, ob c-Src direkt RasGRP3 phosphorylieren kann. Um diese Frage zu beantworten, wurden HEK-293-Zellen mit DNA-Konstrukten für RasGRP3 *plus* c-Src oder *plus* K298M c-Src (alle HA-*getaggt*) transfiziert. Nach EGF-Stimulation der transfizierten Zellen wurden Versuche der Koimmunpräzipitation durchgeführt. Dabei bemühten wir uns, mit RasGRP3 immunpräzipitiertes c-Src im Immunoblot-Verfahren mit einem c-Src-spezifischen monoklonalen Antikörper nachzuweisen, was nicht möglich war.

Als nächstes unternahmen wir den Versuch, in HEK-293-Zellen, die RasGRP3 *plus* Wildtyp c-Src oder RasGRP3 *plus* die Kinase-defiziente Mutante K298M c-Src exprimierten, mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ die Phosphorylierung von RasGRP3 nach EGF-Rezeptor-Stimulation nachzuweisen. Auch diese Versuche lieferten kein Ergebnis, wir konnten in diesen Zellen nach EGF-Stimulation keine signifikante Erhöhung des zellulären Gehaltes an tyrosinphosphoryliertem RasGRP3 nachweisen (Abb. 17).

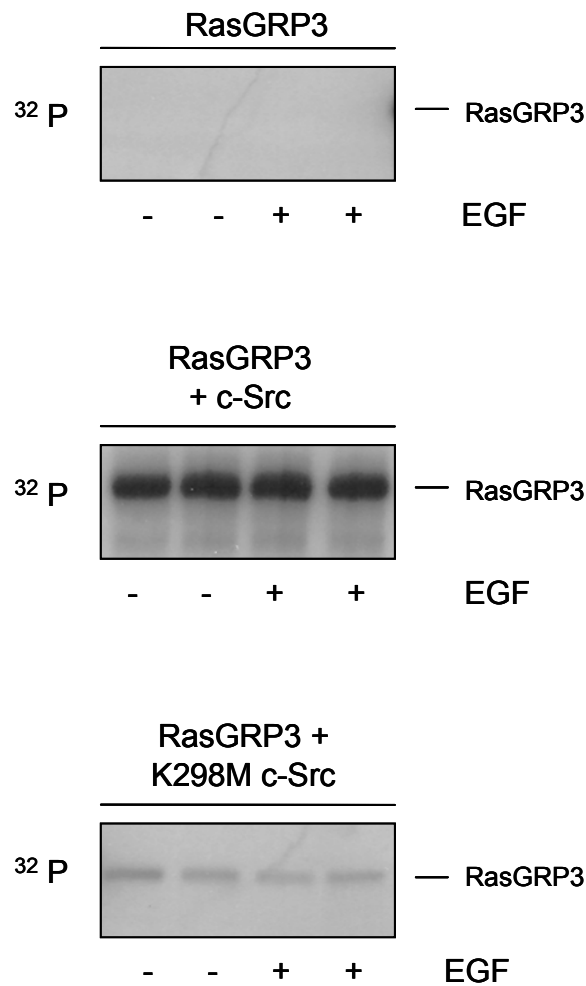


Abbildung 17. Versuch, die Tyrosinphosphorylierung von RasGRP3 durch endogen in HEK-293-Zellen exprimiertes c-Src nachzuweisen. HEK-293-Zellen wurden mit HA-getaggttem RasGRP3 allein (75 μg cDNA) oder *plus* c-Src oder *plus* K298M c-Src (jeweils 150 μg cDNA) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen ohne (-) oder mit (+) 100 ng EGF/ml wie gezeigt stimuliert. Nach der Zelllyse wurde HA-getaggttes RasGRP3 immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden einem *in vitro*-Kinase-Assay mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ unterzogen (10 min Inkubationsdauer). Die Proteine wurden durch die SDS-PAGE aufgetrennt und phosphoryliertes RasGRP3 durch Autoradiographie (^{32}P) nachgewiesen. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis eines typischen Experiments ($n=3$).

Danach führten wir mit in HEK-293-Zellen exprimierten, HA-getaggttem RasGRP3 *in vitro*-Phosphorylierungs-Assays mit rekombinantem c-Src durch. Auch mit diesem Ansatz war die direkte Phosphorylierung von RasGRP3 durch c-Src nicht zu erreichen.

Auf Grund der ergebnislosen Versuche wollten wir nun rekombinantes, GST-getaggttes RasGRP3 in einem *in vitro*-Phosphorylierungs-Assay mit radioaktivem $[\gamma\text{-}$

^{32}P JATP und rekombinantem c-Src einsetzen. Um diese Untersuchungen durchführen zu können, musste zunächst mit GST fusioniertes RasGRP3 aus Sf9-Zellen gereinigt werden, so wie es im Kapitel „Materialien und Methoden“ beschrieben wird.

Für diese Proteingewinnung wurde ein Baculovirus-DNA-Konstrukt gebildet, das für die Sequenz GST-RasGRP3 kodiert. Das Ursprungs-konstrukt pMT2-HA-RasGRP3 wurde durch die Restriktionsendonukleasen *NotI* und *SalI*, der Transfektor pAcGHLT-C durch die Restriktionsendonukleasen *NotI* und *XhoI* aufgespalten. Durch die Restriktion des erstgenannten Konstrukts entstand ein 2075 bp-langes DNA-Fragment, das den offenen Leserahmen von RasGRP3 (2070 bp) besitzt. Bei der Restriktion des Transfektors wurden ein 8722 bp-großes DNA-Fragment (pAcGHLT-C-Fragment) und ein aus 31 Basenpaaren bestehendes Restfragment der multiplen Klonierungsstelle erzeugt. Diese restringierten DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt (Abb. 18).

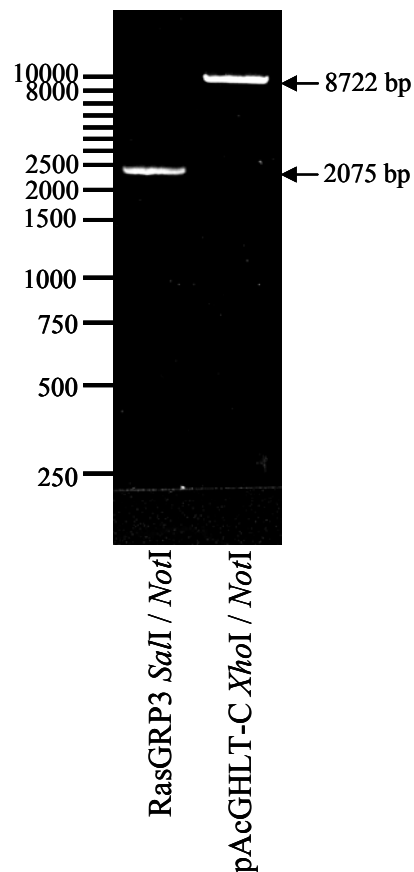


Abbildung 18. Restringierte DNA-Fragmente. Nach Restriktion des Ursprungs-konstrukts pMT2-HA-RasGRP3 durch *NotI* / *SalI* und des Transfektors durch *NotI* / *XhoI* wurden die erhaltenen Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das aus der erstgenannten Spaltung

entstandene Fragment besitzt eine Länge von 2075 bp, durch die zweitgenannte Spaltung entstehen zwei Fragmente mit Größen von 8722 bp (pAcGHLT-C-Fragment) und 31 bp (Restfragment).

Anschließend wurden die restringierten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel extrahiert und das RasGRP3-Konstrukt wurde mit dem pAcGHLT-C-Fragment ligiert. Das durch die Ligation entstandene DNA-Plasmid wies eine Größe von 10797 bp auf und wurde in *E. coli* amplifiziert. Bakterienklone, die dieses Plasmid besaßen, wurden kultiviert und selektioniert. Aus den selektionierten Bakterienkulturen wurde das Plasmid präpariert und einer Restriktionsanalyse unterzogen. Bei der Restriktionsanalyse wurden die Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *NotI* verwendet. Wurden Bakterienklone, die das gewünschte DNA-Konstrukt als Plasmid amplifizierten, aufgeschlossen und die entsprechende DNA präpariert, führte die Restriktion dieses DNA-Konstruktes und die folgende elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente zu einem 8717 bp-großen Vektor-Fragment und einem 2080 bp-langen Insert-Fragment (Abb. 19). Um zu überprüfen, ob sich die Ligation tatsächlich zwischen dem DNA-Fragment mit der RasGRP3-Sequenz und dem Transfervektor ereignet hatte, wurde nach der Restriktionsanalyse das Insert-Fragment sequenziert und damit die Sequenz des offenen Leserahmens für RasGRP3 verifiziert.

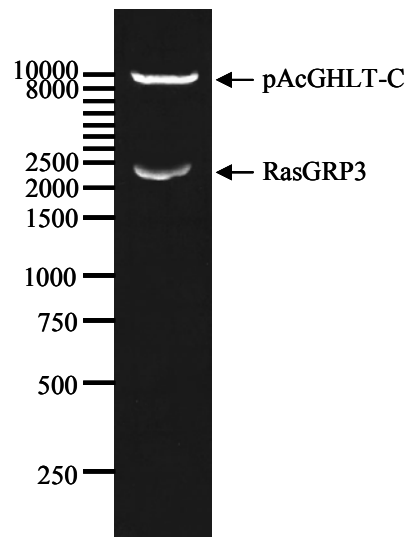


Abbildung 19. DNA-Konstrukt pAcGHLT-C[RasGRP3] nach der *NdeI* / *NotI*-Spaltung. Das DNA-Konstrukt pAcGHLT-C[RasGRP3] besitzt eine berechnete Größe von 10797 bp. Das Vektor-Fragment pAcGHLT-C ist 8717 bp groß, das Insert-Fragment ist 2080 bp lang.

Dann wurde ein in Bezug auf den beladenen Transfervektor positiver DNA-Klon in größerem Maßstab vermehrt und mit der DNA des BaculoGold-Virus in *Sf9*-Zellen rekombiniert. Nach Passagierung und Plaquereinigung des rekombinanten Virus wurden die Virionen durch Zusatz von Polyethylenglykol (PEG) gefällt und die BaV-GST-RasGRP3-Virus-DNA präpariert. Der virale Genomabschnitt, der die Sequenz für RasGRP3 enthielt, wurde mit Hilfe der PCR amplifiziert und die amplifizierten DNA-Abschnitte wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Die Länge der erwarteten PCR-Produkte bei Anwendung von spezifischen Primern, die stromaufwärts und stromabwärts der inserierten RasGRP3-Sequenz in der Baculovirus-Sequenz hybridisierten, wurde berechnet. Das PCR-Produkt mit dem richtigen Insert sollte eine Größe von 2485 bp haben, während das PCR-Produkt ohne Insert nur eine Länge von 383 bp aufweisen sollte. Die elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA-Abschnitte ergab, dass nur das Insert mit der RasGRP3-Sequenz vermehrt wurde (Abb. 20). Dieser DNA-Abschnitt wurde ebenfalls sequenziert und damit dessen Identität gesichert. So wurde gleichzeitig die Rekombination der Baculovirus-DNA mit der RasGRP3-Sequenz bestätigt.

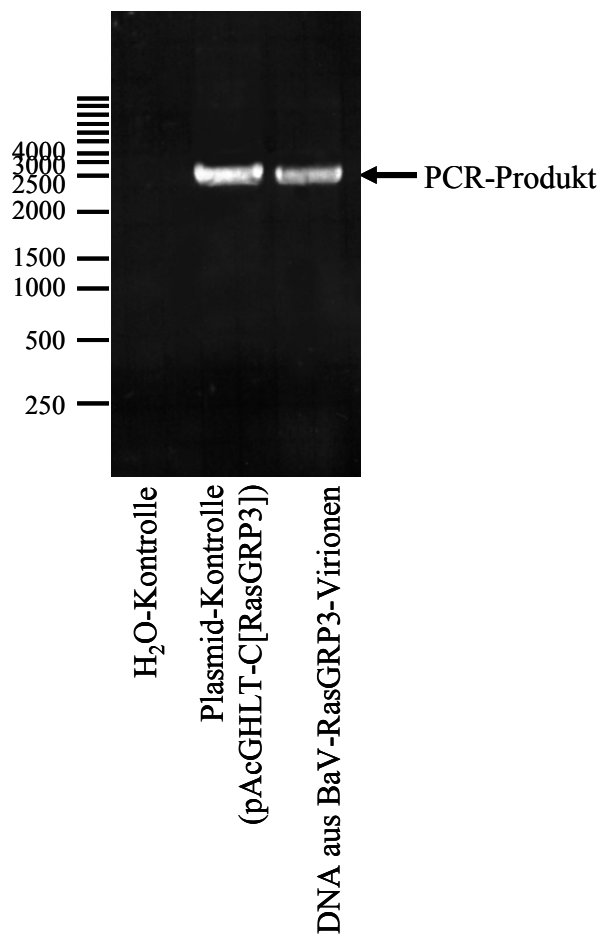


Abbildung 20. Kontroll-PCR mit der aus den Virionen präparierten viralen DNA. Bei den berechneten PCR-Produkten hat das Fragment ohne Insert eine Länge von 383 bp, das Fragment mit RasGRP3-Sequenz-Insert eine Größe von 2485 bp.

Das rekombinante Baculovirus besitzt neben der Sequenzinsertion für das heterologe RasGRP3-Protein auch die Sequenz für die Glutathion-S-Transferase (Abb. 8). Wenn das RasGRP3-Protein in *Sf9*-Zellen exprimiert wird, dann wird es als GST-RasGRP3-Fusionsprotein synthetisiert. Es kann somit spezifisch an immobilisiertes Glutathion gebunden und gereinigt werden. Diese Affinitätsreinigung wurde durchgeführt und das gereinigte, immobilisierte Protein wurde näher untersucht, indem das GST-RasGRP3-Fusionsprotein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Coomassie angefärbt oder das Immunoblot-Verfahren mit einem gegen GST-gerichteten Antikörper angewandt wurde (Abb. 21).

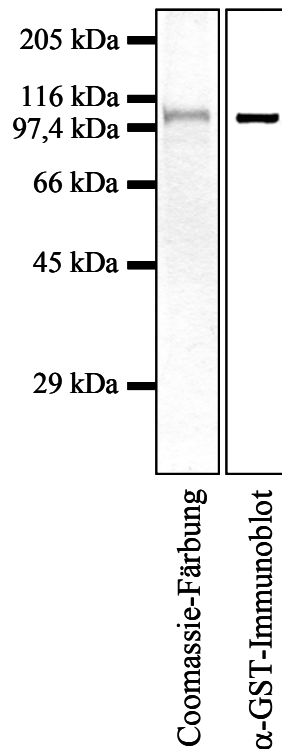


Abbildung 21. Gereinigtes GST-RasGRP3-Protein aus BaV-GST-RasGRP3-infizierten *Sf9*-Zellen. GST-RasGRP3-Fusionsprotein wurde an Glutathion-Sepharose-Beads gebunden und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die linke Spur zeigt die Coomassie-Färbung des immobilisierten Fusionsproteins, die rechte Spur den Immunoblot mit einem anti-Glutathion-S-Transferase-Antikörper (α -GST).

Um die Expression des Fusionsproteins in *Sf9*-Zellen zu optimieren und den Ertrag an gereinigtem Protein zu maximieren, wurde die Expressionskinetik für GST-RasGRP in *Sf9*-Zellen bestimmt. Diese ergab, dass die gewünschte Proteinsynthese zwar 48 h nach Infektion am größten ist (Abb. 22), jedoch eine ausreichende Proteingewinnung bereits nach 24 h möglich ist.

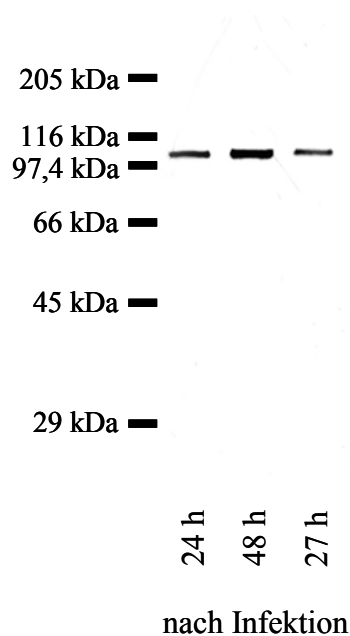


Abbildung 22. Kinetik der GST-RasGRP3-Expression in infizierten *Sf9*-Zellen. GST-RasGRP3-Fusionsprotein wurde an Glutathion-Sepharose-Beads gebunden und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Gezeigt wird die Coomassie-Färbung des immobilisierten Fusionsproteins, das zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion aus den *Sf9*-Zellen gereinigt wurde.

Das gereinigte GST-RasGRP3-Fusionsprotein stand nun für die geplanten *in vitro*-Experimente in geeigneter Menge und Reinheit zur Verfügung. Um auszuschließen, dass das eigentliche GST-Protein an vorhandenen Tyrosinresten phosphoryliert wird, wurden Phosphorylierungs-Assays der gereinigten Glutathion-S-Transferase1 (GST1) mit radioaktivem [γ - 32 P]ATP oder unmarkiertem ATP und rekombinantem c-Src durchgeführt. Dabei konnte keine Tyrosinphosphorylierung des GST-Proteins nachgewiesen werden (Abb. 23).

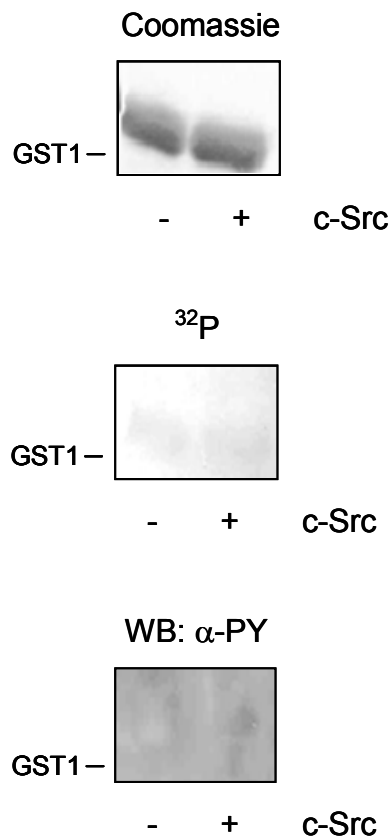


Abbildung 23. Fehlende Tyrosinphosphorylierung des GST1-Proteins durch rekombinantes c-Src. Gereinigtes GST1-Protein wurde *in vitro*-Kinase-Assays unterzogen ohne (-) oder mit (+) rekombinantem c-Src bei Anwesenheit von [γ -³²P]ATP oder unmarkiertem ATP. Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach Coomassie angefärbt. Weder durch Autoradiographie (³²P) noch durch das Immunoblot-Verfahren mit einem anti-Phosphotyrosin (α-PY)-Antikörper konnte eine Tyrosinphosphorylierung nachgewiesen werden. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis eines typischen Experiments ($n=3-5$). WB, Western Blot.

Danach wurde das gereinigte RasGRP3-GST-Fusionsprotein in einem *in vitro*-Phosphorylierungs-Assay mit radioaktivem [γ -³²P]ATP und rekombinantem c-Src eingesetzt. Dabei ergab sich, dass c-Src direkt eine Phosphorylierung des GST-RasGRP3-Fusionsproteins vermittelt, die auf Grund der radioaktiven Markierung detektierbar war (Abb. 24, mittleres Feld). Die *in vitro*-Tyrosinphosphorylierung von GST-getagtem RasGRP3 wurde durch Immunoblots mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper bestätigt (Abb. 24, unteres Feld).

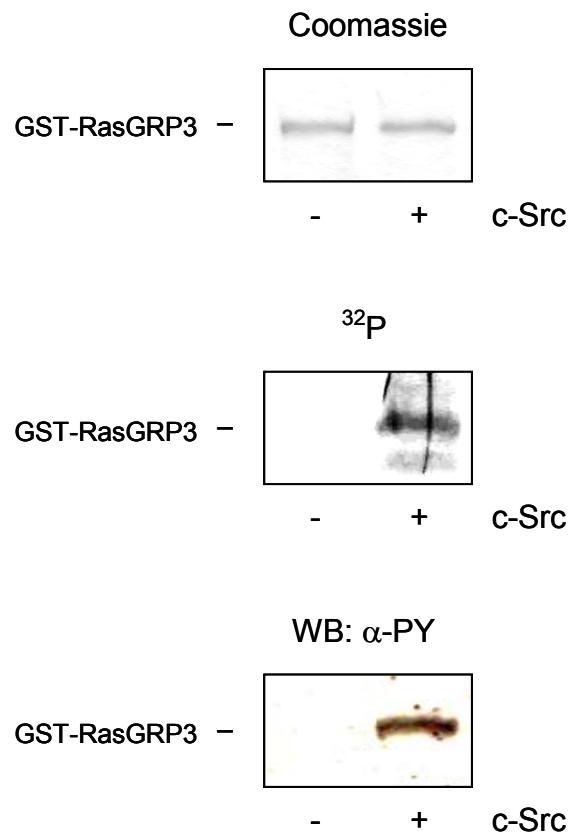


Abbildung 24. RasGRP3-Tyrosinphosphorylierung *in vitro* durch rekombinantes c-Src. Gereinigtes GST-RasGRP3-Fusionsprotein wurde *in vitro*-Kinase-Assays unterzogen ohne (-) oder mit (+) rekombinatem c-Src bei Anwesenheit von [γ -³²P]ATP oder unmarkiertem ATP. Die Proteine wurden durch die SDS-PAGE aufgetrennt und RasGRP3 wurde durch Coomassie-Färbung, durch Autoradiographie (³²P) oder durch das Immunoblot-Verfahren mit einem anti-Phosphotyrosin (α-PY)-Antikörper nachgewiesen. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis eines typischen Experiments ($n=3-5$). WB, Western Blot.

Für den Nachweis, dass c-Src diese Tyrosinphosphorylierung *in vitro* verursacht, wurde bei weiteren Phosphorylierungs-Assays der c-Src-Kinase-Hemmstoff PP₂ eingesetzt, der die Tyrosinphosphorylierung von RasGRP3 durch rekombinantes c-Src aufhob (Abb. 25).

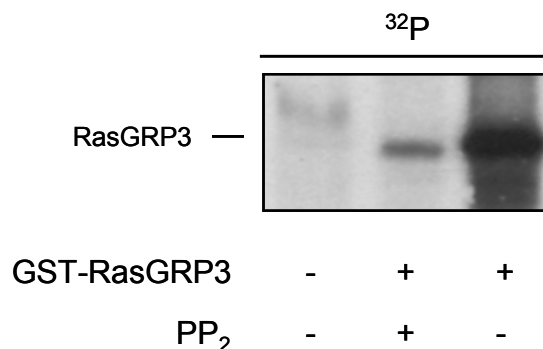


Abbildung 25. Hemmung der *in vitro*-Tyrosinphosphorylierung von RasGRP3 durch PP₂. Gereinigtes GST-RasGRP3-Fusionsprotein wurde *in vitro*-Kinase-Assays unterzogen ohne (-) oder mit (+) rekombinantem c-Src und [γ -³²P]ATP bei Abwesenheit (-) oder Anwesenheit (+) von 10 μ M PP₂. Die Proteine wurden durch die SDS-PAGE aufgetrennt und phosphoryliertes RasGRP3 wurde durch Autoradiographie (³²P) nachgewiesen. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis eines typischen Experiments ($n=3-6$).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass c-Src sowohl *in vivo* als auch *in vitro* den GEF RasGRP3 nach EGF-Rezeptor-Stimulation an Tyrosinresten stimuliert und dass dieser GEF in Abhängigkeit von der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration die Aktivierung der monomeren GTPase Rap2B und damit auch die Aktivierung der PLC- ϵ reguliert.

4. Diskussion

Rezeptor-Tyrosinkinasen stimulieren die PLC- γ_1 durch Rekrutierung der Lipase an den aktivierten Rezeptor und folgende Tyrosinphosphorylierung (Rebecchi & Pentyala, 2000; Schlessinger, 2000; Rhee, 2001; Fukami, 2002). Erst vor wenigen Jahren konnte nachgewiesen werden, dass auch die PLC- ϵ , die durch kleine monomere GTPasen kontrolliert wird (Jin *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2002; Kelley *et al.*, 2004; Harden & Sondek, 2006), durch Rezeptor-Tyrosinkinasen wie EGF- oder PDGF-Rezeptoren reguliert wird. Dabei wurde gezeigt, dass EGF- und PDGF-Rezeptor-Mutanten, die die PLC- γ_1 nicht aktivieren können, trotzdem eine Stimulation von ektopisch exprimierter PLC- ϵ induzieren. Vermutlich werden diese EGF- und PDGF-Rezeptor-Aktionen durch H-Ras und Rap1A-GTPasen vermittelt (Song *et al.*, 2002; Kelley *et al.*, 2004). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Mechanismen der EGF-Rezeptor-vermittelten PLC- ϵ -Stimulation im Zellsystem zu untersuchen, in der eine mögliche Interaktion der PLC-Isoformen γ_1 und ϵ eingeschätzt werden kann. Zu diesem Zweck wurden HEK-293-Zellen, die die an die PLC-gekoppelten-Rezeptoren in gleichem Maße wie die PLC- γ_1 und die PLC- ϵ endogen exprimieren (Schmidt *et al.*, 2000; Evellin *et al.*, 2002; Stope *et al.*, 2004), eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wird beschrieben, dass der EGF-Rezeptor eine PLC- ϵ -Stimulation in diesen Zellen in einer Rap2B-abhängigen Weise induziert und dass an diesem Prozess die PLC γ_1 , c-Src und der Rap/Ras-GEF RasGRP3 beteiligt sind.

Die PLC- und Ca^{2+} -Signalübertragung durch den EGF-Rezeptor wurde durch die Expression von Lipase-inaktiven Mutanten der PLC- γ_1 und PLC- ϵ in einem vergleichbaren Ausmaß reduziert. Die Koexpression der beiden Lipase-inaktiven Mutanten führte zur fast vollständigen Suppression der beiden Rezeptorantworten. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass beide PLC-Isoformen am EGF-Rezeptor-Signalweg beteiligt sind. In Überexpressionsexperimenten der Lipasen wurde bestätigt, dass der EGF-Rezeptor tatsächlich die PLC- γ_1 und die PLC- ϵ , aber weder die PLC- β_1 noch die PLC- δ_1 stimuliert. Weil bekannt ist, dass die PLC- ϵ im Gegensatz zur PLC- γ_1 der Kontrolle durch kleine monomere GTPasen der Ras- und Rho-Familie unterliegt (Harden & Sondek, 2006), wurden verschiedene Verfahren zur Identifizierung der spezifischen GTPase, die an der EGF-Rezeptor-Aktion beteiligt ist, durchgeführt. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten ergeben, dass GTPasen der Ras-Familie wie H-Ras, Rap1A und Rap2B die PLC-Stimulation durch Rezeptoren vermitteln können (Schmidt *et al.*, 2001; Evellin *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2002; Kelley *et*

al., 2004). Nur die Expression von dominant-negativem Rap2B, jedoch nicht von dominant-negativen Mutanten von H-Ras und Rap1A, supprimiert spezifisch die EGF-Rezeptor-induzierte IP₃-Bildung und folgende [Ca²⁺]_i-Erhöhung in HEK-293-Zellen. Des Weiteren führt nur die Expression von konstitutiv-aktivem Rap2B, aber nicht der eng verwandten GTPasen Rap1A und Rap2A, zur deutlichen Verstärkung der IP₃-Bildung in unstimulierten Zellen. Dies wird dahingehend interpretiert, dass Rap2B die PLC- ϵ -Stimulation durch den EGF-Rezeptor in HEK-293-Zellen vermittelt. Die spezifische Rolle von Rap2B konnte durch Verwendung von ektopisch exprimierter PLC- ϵ bekräftigt werden. So bewirkt die Stimulation des EGF-Rezeptors die Translokation der PLC- ϵ an die Plasmamembran und diese Aktion kann durch Expression von konstitutiv-aktivem Rap2B nachgeahmt werden. Die Expression von dominant-negativem Rap2B verhindert diese Rezeptor-Aktion, dagegen hat die Expression der dominant-negativen Mutanten von H-Ras und Rap1A keinen Einfluss auf das Translokationsverhalten. EGF-Stimulation von HEK-293-Zellen kann die Assoziation von Rap2B (aber nicht von Rap1A) mit der PLC- ϵ deutlich verstärken, wie durch Koimmunpräzipitation von PLC- ϵ und Rap2B bestätigt wurde. Insgesamt weisen die Untersuchungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe darauf hin, dass der EGF-Rezeptor die PLC- ϵ -Stimulation in HEK-293-Zellen durch Aktivierung von Rap2B und die Bindung der aktivierten GTPase an die PLC- ϵ , wahrscheinlich an die RA2-Domäne (Song *et al.*, 2002; Kelley *et al.*, 2004), induziert, was dann die Translokation der Lipase an die Plasmamembran zur Folge hat.

Diese Schlussfolgerung unterscheidet sich deutlich von der von anderen Arbeitsgruppen berichteten Beteiligung der GTPasen an der Regulation von ektopisch-exprimierter PLC- ϵ durch EGF- und PDGF-Rezeptoren in anderen Zelltypen. So supprimiert die Expression von dominant-negativem S17N H-Ras in COS-7-Zellen (Song *et al.*, 2001) die EGF-induzierte Translokation der PLC- ϵ an die Plasmamembran. Die Expression dieser dominant-negativen Mutante verhindert auch die EGF- und PDGF-induzierte PLC- ϵ -Stimulation in BaF3-Zellen und in COS-7-Zellen (Song *et al.*, 2002; Kelley *et al.*, 2004). Außerdem war über die GTPase Rap1A berichtet worden, dass sie an der PLC- ϵ -Signalübertragung in COS-7-Zellen beteiligt ist (Jin *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2002). Dagegen beeinflusst die Expression von S17N H-Ras oder von S17N Rap1A in HEK-293-Zellen weder die EGF-induzierte Translokation der PLC- ϵ an die Plasmamembran noch die PLC- und Ca²⁺-Signalübertragung (Stope *et al.*, 2004). Wir konnten nachweisen, dass nur die

dominant-negative Mutante S17N Rap2B die PLC- ϵ -Translokation an die Plasmamembran hemmt und die PLC- und Ca^{2+} -Signalübertragung supprimiert.

Die Überexpression von verschiedenen GEFs für Rap-GTPasen wie C3G, PDZ, Repac, RasGRP1 und RasGRP2 (Cullen & Lockyer, 2002; Quilliam *et al.*, 2002) hatte keinen Effekt auf die EGF-induzierte Rap2B- und PLC- ϵ -Aktivierung. Dagegen verstärkt die Überexpression von RasGRP3 deutlich die Rap2B-Aktivierung, genauso werden die durch die EGF-Rezeptor-Stimulation induzierte IP_3 -Bildung und der folgende $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg signifikant erhöht und somit die Aktivität der PLC- ϵ beeinflusst. Dieser Effekt wurde durch Koexpression von dominant-negativem Rap2B völlig aufgehoben.

RasGRP3-mRNA wird ubiquitär transkribiert (Rebhun *et al.*, 2000), konnte aber mittels *in situ*-Hybridisierung hauptsächlich in Oligodendrogliazellen des ZNS, in den glomerulären Mesangiumzellen der Niere (Yamashita *et al.*, 2000), in endokrinen Geweben (Ozaki *et al.*, 2005), in embryonalen Blutgefäßen sowie in adulten Blutgefäßen während der Schwangerschaft und der Tumorgenese (Roberts *et al.*, 2004) nachgewiesen werden. Daneben ist RasGRP3 auch in den Organen Herz und Lunge vorhanden (Ohba *et al.*, 2000a; Cullen & Lockyer, 2002; Quilliam *et al.*, 2002).

Durch die Reverse Transkriptase-PCR konnte nachgewiesen werden, dass RasGRP3 tatsächlich in HEK-293-Zellen exprimiert wird. RasGRP3 ist ein durch die *second messenger* Ca^{2+} und DAG regulierter GEF für Ras- und Rap-GTPasen. Aus diesem Grund konnte die Hypothese angenommen werden, dass diese beiden *second messenger* und das für deren Akkumulation verantwortliche Enzym (eine Phospholipase C) an der Rap2B-Aktivierung durch den EGF-Rezeptor beteiligt sind. In der Tat bewirkt die Expression von Lipase-inaktiver PLC- γ_1 genauso wie die Chelatbildung von intrazellulären Ca^{2+} -Ionen mit BAPTA/AM eine beträchtliche Reduktion der Rap2B-Aktivierung nach EGF-Rezeptor-Stimulation, während Ca^{2+} -Ionophore wie Ionomycin die EGF-Rezeptorantwort nachahmen. Weil die Expression von Lipase-inaktiver PLC- ϵ (H1144L PLC- ϵ) genauso wie die Expression von Lipase-inaktiver PLC- γ_1 (H335Q PLC- γ_1) die EGF-induzierte PLC-Stimulation erniedrigt und weil die Expression von dominant-negativer PLC- ϵ die Rap2B-Aktivierung nicht beeinflusst, wurde die Schlussfolgerung aufgestellt, dass die PLC- γ_1 -Stimulation durch den EGF-Rezeptor *upstream* der RasGRP3-vermittelten Rap2B-Aktivierung und PLC- ϵ -Stimulation erfolgt. Auch wenn eine Beteiligung der PLC- ϵ an der lang-anhaltenden Rap2B-Aktivierung nicht völlig ausgeschlossen werden kann, wurde vor kurzer Zeit berichtet, dass einmal aktiviertes Rap2B für einen eher langen Zeitraum aktiv bleibt,

was am wahrscheinlichsten auf die deutlich geringere Sensitivität von Rap2-Proteinen gegenüber Rap-spezifischen GTPase-aktivierenden Proteinen zurückzuführen ist (Ohba *et al.*, 2000b). In diesem Verhalten unterscheiden sich Rap2-GTPasen deutlich von den verwandten Rap1-GTPasen.

Oh-hora *et al.* hatten vor wenigen Jahren nachgewiesen, dass die PLC- γ_2 *upstream* des GEF RasGRP3 in der B-Zellrezeptor (BCR)-induzierten Ras-Aktivierung in DT40-Zellen agiert (Oh-hora *et al.*, 2003), was in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit präsentierten Ergebnissen steht. In Phospholipase C- γ_2 -defizienten DT40-Zellen sind die Ras- und ERK-Aktivierung nach BCR-Stimulation signifikant abgeschwächt. PLC- γ_2 -defiziente DT40-Zellen, die zusätzlich eine Membran-lokalisierte Form von RasGRP3 exprimieren, weisen eine normale Ras-Aktivierung nach BCR-Stimulation auf und für diese Ras-Aktivierung ist keine DAG-Bindung an RasGRP3 notwendig. BCR-Stimulation induziert die Translokation von RasGRP3 an die Plasmamembran, ein Prozess, der von der intakten C1-Domäne in RasGRP3 und der Bildung von DAG abhängig ist. In DT40-B-Zellen ist das von der PLC- γ_2 freigesetzte DAG zwar für die Aktivierung von RasGRP3 notwendig, aber anscheinend nicht ausreichend. In RasGRP3-defizienten DT40-B-Zellen verlaufen die BCR-vermittelte IP₃-Bildung und die Ca²⁺-Mobilisation wie in untransfizierten Kontrollzellen. Außerdem werden in DT40-B-Zellen eine BCR-induzierte Translokation von RasGRP3 in die perinukleäre Region und eine Phosphorylierung von RasGRP3 beobachtet, die neben der DAG-Bindung an die C1-Domäne von RasGRP3 die anhaltende Ras-Aktivierung nach BCR-Stimulation begünstigen könnten. Allerdings kommt es nach 10-minütiger BCR-Stimulation zu einer Ras-Inaktivierung, obwohl RasGRP3 noch in der Plasmamembran lokalisiert ist. Vermutlich ist eine RasGRP3-Inaktivierung dafür verantwortlich, die unabhängig von der Membranlokalisation stattfindet und anscheinend auf die Aktivierung von RasGAPs zurückzuführen ist.

In diesem Zusammenhang hatten Teixeira *et al.* berichtet, dass RasGRP3 nach Gabe von Phorbol-12-Myristo-13-Acetat (PMA) durch Proteinkinase C-Isoformen (PKC- θ und PKC- β_2) in Ramos-B-Zellen phosphoryliert wird (Teixeira *et al.*, 2003). Dieser Phosphorylierung folgt eine Aktivierung des Ras/ERK-Signalwegs.

Phorbolester wie PMA sind natürliche Produkte, die durch ihre potente tumorfördernde Wirkung im Bereich der Haut bekannt wurden und deren zuerst beschriebene Zielstrukturen PKC-Isoformen waren (Lorenzo *et al.*, 2001). Einerseits werden PKC-Isoformen durch PMA stimuliert und PKC-Inhibitoren vermindern die RasGRP3-Phosphorylierung und anschließende Ras-Aktivierung nach PMA-Gabe

(Lorenzo *et al.*, 2001; Zheng *et al.*, 2005). Andererseits kann PMA in RasGRP3-transfizierten Jurkat T-Zellen RasGRP3 stimulieren und PKC-unabhängig die Ras/ERK-Signalübertragung aktivieren (Madani *et al.*, 2004).

Die Regulation von RasGRP3 wurde in den letzten Jahren genauer untersucht. So haben Zheng *et al.* durch Massenspektrometrie nachgewiesen, dass die PKC- θ RasGRP3 an Thr133 *in vitro* phosphoryliert (Zheng *et al.*, 2005). In Jurkat T-Zellen verknüpft RasGRP1 den T-Zell-Rezeptor, die PLC- γ_1 und DAG auf der einen Seite mit der Ras-Signalübertragung auf der anderen Seite. In Analogie zu den T-Zellen involviert der BCR-PLC- γ_2 -DAG-Signalweg den GEF RasGRP3. Bei der Stimulation von Ramos-B-Zellen kommt es zur mehrfachen Phosphorylierung von RasGRP3 und in der Folge zur Ras-Aktivierung. Die ebenfalls in Ramos-B-Zellen exprimierte nPKC-Isoform PKC- θ kann RasGRP3 phosphorylieren und aktivieren. Die Phosphorylierungsstelle liegt in der Nähe der CDC25-Domäne. In Rat2-Zellen, die RasGRP3 exprimieren, kann RasGRP3 Rap1A aktivieren und PMA ein deutliches Wachstum *in vitro* induzieren. Die Expression einer Thr133Ala-Mutante von RasGRP3 verhindert diese Induktion und auch die Aktivierung von Rap1A (Zheng *et al.*, 2005). In HEK-293-Zellen, die mit PKC- θ und RasGRP3 kotransfiziert wurden, kommt es zur Phosphorylierung von RasGRP3 durch die PKC- θ und zur Aktivierung des Ras-Signalweges. Pan-PKC-Inhibitoren hemmen die PMA-stimulierte RasGRP3-Phosphorylierung und vermindern die Ras/ERK-Signalübertragung.

In CHO-Zellen oder in LN-229-Zellen, die heterolog RasGRP3 exprimieren, induziert PMA die Translokation von RasGRP3 in die perinukleäre Region und an die Kernmembran sowie die PKC- δ -abhängige Phosphorylierung von RasGRP3 an Serinresten. Diese Phosphorylierung wird durch einen PKC- δ -spezifischen Inhibitor genauso blockiert wie durch eine Kinase-defiziente PKC- δ -Mutante (Brodie *et al.*, 2004). Allerdings konnte eine Tyrosinphosphorylierung von RasGRP3 nicht beobachtet werden. Während die PKC- δ in unstimulierten CHO- und LN-229-Zellen ubiquitär in der Zelle vorkommt, ist RasGRP3 im Zytoplasma lokalisiert. PMA-Stimulation führt zur Translokation der PKC- δ an die Plasmamembran gefolgt von einer geringeren Translokation in die perinukleäre Region. Überexpression entweder von PKC- δ oder von RasGRP3 verstärkt die Aktivierung der Ras/ERK-Signalübertragung durch PMA, dagegen hemmte die Koexpression von PKC- δ und RasGRP3 die Ras/ERK-Signalübertragung (Brodie *et al.*, 2004). Somit könnten Interaktionen von PKC- δ und RasGRP3 die Aktivierung des Ras/ERK-Signalwegs bei hoher Überexpression von PKC- δ negativ regulieren.

In DT40-B-Zellen unterliegt RasGRP3 nach BCR-Stimulation einer Thr133-Phosphorylierung. Deletion der Phospholipase C- γ_2 oder pharmakologische Hemmung von typischen PKC-Isoformen reduziert die Thr133-Phosphorylierung und die Ras-Aktivierung (Aiba *et al.*, 2004). In DT40-B-Zellen ist die Rekrutierung von RasGRP3 an die Plasmamembran für die Ras-Aktivierung notwendig, aber nicht ausreichend. Neben der Translokalisierung von RasGRP3 an die Plasmamembran nach BCR-Stimulation kann RasGRP3 auch in die perinukleäre Region und an den Golgi-Komplex translozieren, wo Ras aktiviert wird. RasGRP3 kann an den vier Aminosäureresten Thr133, Ser139, Ser167 und Ser601 phosphoryliert werden. Endogene typische PKC-Isoformen, die durch PMA aktiviert werden, können RasGRP3 in HEK-293-Zellen an Thr-133 phosphorylieren. Endogenes RasGRP3 wird an Thr133 in einer BCR-abhängigen Weise phosphoryliert. Deletion von PLC- γ_2 oder die Behandlung mit einem Inhibitor typischer PKC-Isoformen hemmt die Phosphorylierung an Thr133 in DT40-B-Zellen (Aiba *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu Zheng *et al.* zeigten Aiba *et al.*, dass nicht die PKC- δ , sondern hauptsächlich die PKC- β in B-Zellen RasGRP3 an Thr133 phosphoryliert. RasGRP3 wird *in vitro* durch die PKC- β phosphoryliert. Auch die Koexpression von RasGRP3 mit der PKC- β in 293T-Zellen führt zur Thr133-Phosphorylierung und Inhibitoren der typischen PKC-Isoformen vermindern die Thr133-Phosphorylierung in BCR-stimulierten Zellen. Die Ras-Aktivierung in PKC- δ -defizienten DT40-B-Zellen verläuft anscheinend normal. Nach BCR-Stimulation gebildetes DAG induziert die Rekrutierung von PKC- β und RasGRP3 an die Plasmamembran, wodurch RasGRP3 an Thr133 phosphoryliert werden kann, was für die vollständige Aktivierung von RasGRP3 wesentlich ist (Aiba *et al.*, 2004). Die Bindung von DAG an die C1-Domäne von RasGRP3 könnte die Bindungsaffinität von RasGRP3 mit der Plasmamembran erhöhen und auf diese Weise dessen enzymatische Aktivität verstärken.

Über die Regulation von RasGRP3, z. B. durch Phosphorylierungen oder die Bindung von Liganden an die C1-Domäne, und deren Auswirkungen auf den Zellmetabolismus ist bisher wenig bekannt. Sowohl RasGRP1 als auch RasGRP3 aktivieren in PC12-Zellen die MEKK-Signalübertragung *via* Aktivierung von Ras, während RasGRP2 Rap1 aktiviert und die Ras-abhängige Aktivierung der MEKK-Signalübertragung hemmt (Ozaki *et al.*, 2005). Ozaki *et al.* haben gezeigt, dass RasGRP3 auch in endokrinen Geweben exprimiert wird und an der Phorboloster-induzierten, Ca^{2+} -abhängigen und PKC-unabhängigen Exozytose von Wachstumshormon (GH) beteiligt ist. PMA induziert in PC12-Zellen nicht nur die

Exozytose von GH, sondern auch die Aktivierung der MEKK-Signalübertragung, wobei die pharmakologische Hemmung der PMA-induzierten MEKK-Signalübertragung die Exozytose nicht beeinflusste (Ozaki *et al.*, 2005).

RasGRP3 bindet Phorbolster wie PMA mit hoher Affinität und dadurch kommt es zur Aktivierung der Austauschaktivität von RasGRP3 in intakten Zellen, was sich durch einen Anstieg von Ras-GTP und die Phosphorylierung der extrazellulär Signal-regulierten Kinasen manifestiert. Diese Bindung ist abhängig von anionischen Membranlipiden wie Phosphatidylserin, was charakteristisch für die Phorbolster-induzierte Bindung an C1-Domänen-Proteine ist. PMA und andere DAG-Analoga induzieren in HEK293-Zellen die Umverteilung von RasGRP3 an die Plasmamembran und/oder in die perinukleäre Region (Lorenzo *et al.*, 2001). Die Expression von RasGRP3 in vielen Geweben und dessen Fähigkeit, die kleine GTPase Ras zu modulieren, könnte relevant sein im Zusammenhang mit der Phorbolster-tumorfördernden Aktivität (Lorenzo *et al.*, 2001). Die Expression von RasGRP3 in HEK-293-Zellen induziert eine schwache Aktivierung von endogenem Ras und diese Aktivierung wird verstärkt durch die Behandlung mit PMA (Lorenzo *et al.*, 2001). Ras-Proteine müssen an der inneren Schicht der Plasmamembran lokalisiert sein, um biologisch aktiv zu sein. Durch Immunfluoreszenz wurde nachgewiesen, dass endogenes Ras an der Plasmamembran von HEK-293-Zellen lokalisiert ist (Lorenzo *et al.*, 2001). Dagegen ist RasGRP3 in unstimulierten Zellen hauptsächlich im Zytosol und in der perinukleären Region lokalisiert (Lorenzo *et al.*, 2001). PMA verursacht konzentrationsabhängig die Translokation von RasGRP3 an die Plasmamembran und/oder in die perinukleäre Region, an die Kernmembran, an den Golgi-Apparat und an die Endosomen, in den beiden zuletzt genannten Organellen ist das kleine G-Protein Rap1 lokalisiert. Bei hohen PMA-Konzentrationen aktiviert RasGRP3 eher Rap1 als Ras. Die konzentrationsabhängige Translokation von RasGRP3 ist ein wichtiger Mechanismus für die differenzielle Modulation der Rap1- und Ras-Aktivität in Zellen, der von Ort und Ausmaß der intrazellulären DAG-Bildung abhängt (Lorenzo *et al.*, 2001).

Es ist bekannt, dass GEFs Ras und verwandte Signalmoleküle direkt modulieren und dass die Deregulation dieser Signalmoleküle mit Karzinogenese und Tumorprogression assoziiert ist (Lorenzo *et al.*, 2001). Das RasGRP3-Gen liegt auf dem Genlocus 2p23. Leukämien und Lymphome sind häufig begleitet von chromosomalen Translokationen und/oder Deletionen. Bei den primären Formen der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) kann in mehr als 50% aller Zellen die konstitutive

Aktivierung der MEKK-Signalübertragung beobachtet werden. Chromosomale Rearrangements beeinflussen spezifisch den 2p23-Genlocus und ereignen sich in einer Vielzahl von Leukämien, was darauf hinweist, dass ein oder mehrere Gene in diesem Areal die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen beeinflussen können. Zu diesen Genen gehört auch das Anaplastische Leukämie-Kinase (ALK)-Gen, das ebenfalls auf dem Chromosom 2p23 liegt. Die chromosomale Lokalisation des RasGRP3-Gens weist auf dessen potenzielle Rolle bei malignen Erkrankungen hämatopoetischen Ursprungs hin, die sorgfältig evaluiert werden sollte (Lorenzo *et al.*, 2001).

RasGRP3 spielt wahrscheinlich nicht nur bei verschiedenen Leukämieformen, sondern auch bei der Angiogenese eine Rolle. So stellten Roberts *et al.* fest, dass in von embryonalen Stammzellen gebildeten Blutgefäßen, die RasGRP3 exprimieren, die PMA-Stimulation eine deutlich abweichende Morphogenese bewirkt. Anstelle richtig verzweigter Blutgefäße (Plexus von dünnen Gefäßen mit Verzweigungen in einem regulären Intervall) entstehen große endotheliale Blätter mit nur wenigen Verzweigungen (Roberts *et al.*, 2004). Weil das RasGRP3-Gen ein durch den *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) reguliertes Gen ist, wird die endotheliale RasGRP3-Transkription als Antwort auf eine VEGF-Rezeptor-Stimulation in einer Dosis-abhängigen Weise gesteigert. Die Expression von VEGF und des VEGF-Rezeptors ist mit der Neonangiogenese beim Embryo und beim Erwachsenen assoziiert und sie findet dauerhaft im Glomerulus der Niere überall dort statt, wo sich auch die RasGRP3-Expression nachweisen lässt. Basierend auf diesen Ergebnissen kann man mutmaßen, dass die Aktivierung der VEGF-Signalübertragung die RasGRP3-Expression *in vivo* induzieren könnte und dass RasGRP3 Signale transduziert, die die angiogene Aktivität modulieren (Roberts *et al.*, 2004). Die RasGRP3-Aktivität könnte vaskuläre Komplikationen (diabetische Nephropathie und Retinopathie) bei Krankheiten begünstigen, die durch einen Überschuss an DAG gekennzeichnet sind, wie z. B. Diabetes mellitus. Somit könnte RasGRP3 ein neues Ziel für Therapeutika sein, die auf eine Verbesserung von diabetischen Symptomen zielen (Roberts *et al.*, 2004).

Da RasGRPs eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und Apoptose haben, ist die Entwicklung von Liganden für RasGRPs ein attraktives Ziel für die medikamentöse Therapie von malignen Tumorerkrankungen. Wegen der Komplexität der RasGRP3-Signalübertragung, welche von der Isoform, dem Zelltyp und dem intrazellulären Zusammenhang abhängig ist, existiert die Gelegenheit, Wirkstoffe mit hoher Spezifität

zu entwickeln, um so bestimmte RasGRP3-vermittelte-Signalereignisse zu beeinflussen (Braun *et al.* 2005).

Die möglichen Regulationsmechanismen der RasGRP3-Aktivierung und deren Auswirkung auf Zelldifferenzierung und -proliferation sind sehr komplex. Die RasGRP3-Aktivierung und deren Folgen hängen nicht nur davon ab, ob Zellmembranrezeptoren stimuliert und in der Folge intrazelluläre Signalproteine aktiviert werden, sondern sie sind auch vom Zelltyp und dem von diesem Zelltyp exprimierten Genprodukten, die die RasGRP3-Aktivität modifizieren können, abhängig.

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass in HEK-293-Zellen zusätzlich zu den von der PLC- γ_1 freigesetzten Signalmolekülen die Tyrosinphosphorylierung von RasGRP3 für die Rap2B-Aktivierung nach EGF-Rezeptor-Stimulation anscheinend notwendig ist. Wie sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden konnte, wird RasGRP3 nicht durch die EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase selbst phosphoryliert, sondern durch die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase c-Src. Die pharmakologische Hemmung von c-Src (mittels PP₂) und die Expression einer kinase-defizienten Mutante von c-Src (K298M c-Src) hemmen nicht nur die Phosphorylierung von RasGRP3, sondern auch die EGF-induzierte Rap2B-Aktivierung und PLC-Stimulation. Dagegen hat die Expression einer Kinase-defizienten Mutante von Pyk₂ (K457A Pyk₂), das eine Ca²⁺-aktivierte zytosolische Tyrosinkinase ist, weder einen Einfluss auf die RasGRP3-Phosphorylierung noch auf die EGF-induzierte Rap2B-Aktivierung und PLC- ϵ -Stimulation. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die Rap2B-Aktivierung durch RasGRP3 anscheinend der doppelten Kontrolle durch zwei direkte EGF-Rezeptor-Effektoren unterliegt, nämlich durch PLC- γ_1 und c-Src (Abb. 26). So könnte der aktivierte EGF-Rezeptor als eine Plattform funktionieren, der sich nach seiner extrazellulären Stimulation zusammensetzt und PLC- γ_1 und c-Src aktiviert. Diese beiden Proteine rekrutieren RasGRP3, Rap2B und die PLC- ϵ zu einem Signalkomplex an der Plasmamembran und ermöglichen auf diese Weise eine schnelle und effiziente Signaltransduktion.

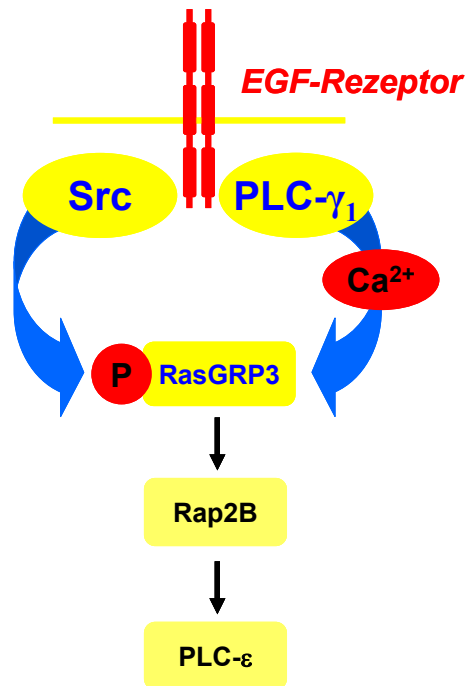


Abbildung 26. Modell der EGF-Rezeptor-vermittelten Stimulation der PLC-ε. Für weitere Erläuterungen siehe Text.

Schließlich wird in der vorliegenden Arbeit berichtet, dass die PLC- und Ca²⁺-Signalübertragung durch den EGF-Rezeptor eine zusammengesetzte Aktion der PLC-γ₁ und der PLC-ε ist. Außerdem wird nachgewiesen, dass die PLC-ε-Stimulation anscheinend durch die zwei direkten EGF-Rezeptor-Effektoren PLC-γ₁ und c-Src initiiert wird, die dann durch Bildung von *second messengern* und insbesondere durch die Tyrosinphosphorylierung den Austauschfaktor RasGRP3 aktivieren. Dieser katalysiert den GTP/GDP-Austausch von Rap2B und führt somit zur Aktivierung dieser monomeren GTPase. Aktiviertes Rap2B assoziiert schließlich mit der PLC-ε und transloziert diese Lipase zu deren Substrat an die Plasmamembran.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rezeptor-Tyrosinkinase-Regulation der Phospholipase C- ϵ (PLC- ϵ), die von Ras- und Rho-ähnlichen GTPasen kontrolliert wird, in HEK-293-Zellen näher untersucht. Diese Zellen exprimieren den an die PLC- ϵ -gekoppelten *Epidermal Growth Factor* (EGF)-Rezeptor endogen.

Die PLC- und Ca^{2+} -Signalübertragung durch den EGF-Rezeptor, der sowohl die PLC- γ_1 als auch die PLC- ϵ aktiviert, wird spezifisch durch Inaktivierung der Ras-verwandten GTPasen mit Toxinen von *Clostridium*-Spezies und durch Expression von dominant-negativem Rap2B unterdrückt. EGF bewirkt eine schnelle und anhaltende GTP-Beladung von Rap2B, die Bindung von Rap2B an die PLC- ϵ und die Rap2B-abhängige Translokation der PLC- ϵ an die Plasmamembran. Zwar wird die GTP-Beladung von Rap2B nach EGF-Stimulation durch Chelatbildung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionen und durch Expression einer Lipase-inaktiven Mutante der PLC- γ_1 gehemmt, aber weil die PLC- ϵ in dem beschriebenen Signalweg Rap2B nachgeschaltet ist, hatte die Expression einer Lipase-inaktiven Mutante der PLC- ϵ keinen Einfluss auf die Rap2B-Aktivierung.

Die Expression von RasGRP3 (*Ras Guanine nucleotide Releasing Protein 3*), einem Ca^{2+} /Diacylglycerol-regulierten Guaninnukleotid-Austauschfaktor für Ras-ähnliche GTPasen, verstärkte die GTP-Beladung von Rap2B und die PLC-/ Ca^{2+} -Signalübertragung durch den EGF-Rezeptor. Die Expression anderer Austauschfaktoren für Ras-ähnliche GTPasen, insbesondere von RasGRP 1 und 2, konnte die Rap2B-Aktivierung nach EGF-Rezeptor-Stimulation nicht beeinflussen. EGF induziert die Tyrosinphosphorylierung von RasGRP3, aber nicht von RasGRP1. Wie sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden konnte, wird RasGRP3 nicht durch die EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase selbst phosphoryliert, sondern durch die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase c-Src. Die direkte Tyrosinphosphorylierung von rekombinantem RasGRP3 konnte durch rekombinantes Src *in vitro* nachgewiesen werden. Die Hemmung von c-Src *in vivo* interferiert mit der EGF-induzierten Rap2B-Aktivierung und PLC-Stimulation.

Zusammengefasst weisen die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse darauf hin, dass der EGF-Rezeptor die Aktivierung von Rap2B *via* PLC- γ_1 -Aktivierung und Tyrosinphosphorylierung von RasGRP3 durch c-Src triggert, was schließlich zur Stimulation der PLC- ϵ führt.

6. Literaturverzeichnis

- 1) **Adelmann, H.G. (1997):** A frequency-domain Gaussian filter module for quantitative and reproducible high-pass, low-pass, and band-pass filtering of images. *Am. Lab.* 29, 27-33.
- 2) **Aiba, Y., Oh-hora, M., Kiyonaka, S., Kimura, Y., Hijikata, A., Mori, Y. & Kurosaki, T. (2004):** Activation of RasGRP3 by phosphorylation of Thr-133 is required for B cell receptor-mediated Ras activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 16612-16617.
- 3) **Asubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1989):** Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, N.Y.
- 4) **Beavo, J.A. & Brunton, L.L. (2002):** Cyclic nucleotide research - still expanding after half a century. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 710-718.
- 5) **Berridge, M.J., Lipp, P. & Bootman, M.D. (2000):** The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1, 11-21.
- 6) **Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979):** A rapid and alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7, 1513.
- 7) **Boguski, M.S. & McCormick, F. (1993):** Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366, 643-654.
- 8) **Bos, J.L. (2003):** Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 733-738.
- 9) **Bradford, M.M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- 10) **Braun, D.C., Cao, Y., Wang, S., Garfield, S.H., Hur, G.M. & Blumberg, P.M. (2005):** Role of phorbol ester localization in determining protein kinase C or RasGRP3 translocation: real-time analysis using fluorescent ligands and proteins. *Mol. Cancer Ther.* 4, 141-150.
- 11) **Brodie, C., Steinhart, R., Kazmirsky, G., Rubinfeld, H., Hyman, T., Ayres, J.N., Hur, G.M., Toth, A., Yang, D., Garfield, S.H., Stone, J.C. & Blumberg, P.M. (2004):** PKC δ associates with and is involved in the phosphorylation of RasGRP3 in response to phorbol esters. *Mol. Pharmacol.* 66, 76-84.
- 12) **Brose, N., & Rosenmund, C. (2002):** Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J. Cell Sci.* 115, 4399-4411.

- 13) **Chang, J.-S., Seok, H., Kwon, T.-K., Min do, S., Ahn, B.-H., Lee, Y.H., Suh, J.-W., Kim, J.-W., Iwashita, S., Omori, A., Ichinose, S., Numata, O., Seo, J.-K., Oh, Y.S. & Suh, P.-G. (2002):** Interaction of elongation factor-1 α and pleckstrin homology domain of phospholipase C- γ 1 with activating its activity. *J. Biol. Chem.* 277, 19697-19702.
- 14) **Chen, C.A. & Okayama, H. (1988):** Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *BioTechniques* 6, 632-638.
- 15) **Cheng, H.-F., Jiang, M.-J., Chen, C.-L., Liu, S.-M., Wong, L.-P., Lomasney, J.W. & King, K. (1995):** Cloning and identification of amino acid residues of human phospholipase C δ 1 essential for catalysis. *J. Biol. Chem.* 270, 5495-5505.
- 16) **Clyde-Smith, J., Silins, G., Gartside, M., Grimmond, S., Etheridge, M., Apolloni, A., Hayward, N., & Hancock, J.F. (2000):** Characterization of RasGRP2, a plasma membrane-targeted, dual specificity Ras/Rap exchange factor. *J. Biol. Chem.* 275, 32260-32267.
- 17) **Cullen, P.J., & Lockyer, P.J. (2002):** Integration of calcium and Ras signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 339-348.
- 18) **Dempsey, E.C., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D., Fields, A.P., Reyland, M.E., Insel, P.A. & Messing, R.O. (2000):** Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 279, L429-438.
- 19) **De Rooij, J., Rehmann, H., van Triest, M., Cool, R.H., Wittinghofer, A. & Bos, J.L. (2000):** Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J. Biol. Chem.* 275, 20829-20836.
- 20) **Ebinu, J.O., Bottorff, D.A., Chan, E.Y.W., Stang, S.L., Dunn, R.J. & Stone, J.C. (1998):** RasGRP, a Ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science*. 280, 1082-1086.
- 21) **Erhardt, A., Erhardt, G.R.A., Guo, X. & Schrader, J.W. (2002):** Ras and relatives – job sharing and networking keep an old family together. *Exp. Hematol.* 30, 1089-1106.
- 22) **Evellin, S., Nolte, J, Tysack, K., vom Dorp, F., Thiel, M., Oude Weernink, P. A., Jakobs, K.H., Webb, E.J., Lomasney, J.W., & Schmidt, M. (2002):** Stimulation of phospholipase C- ϵ by the M₃ muscarinic acetylcholine receptor mediated by cyclic AMP and the GTPase Rap2B. *J. Biol. Chem.* 277, 16805-16813.
- 23) **Fantl, W.J., Johnson, D.E. & Williams, L.T. (1993):** Signalling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 453-481.
- 24) **Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. & Danielsen, M. (1987):** Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413-7417.

- 25) **Franke, B., Akkerman, J.W.N. & Bos, J.L. (1997):** Rapid Ca^{2+} -mediated activation of Rap1 in human platelets. *EMBO J.* 16, 252-259.
- 26) **Fukami, K. (2002):** Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. *J. Biochem.* 131, 293-299.
- 27) **Goldberg, J. (1998):** Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* 95, 237-248.
- 28) **Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. (1985):** A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.
- 29) **Hall, A. (2000):** GTPases. *Frontiers in Molecular Biology*. Oxford: Oxford University Press.
- 30) **Hanoune, J. & Defer, N. (2001):** Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 145-174.
- 31) **Harden, T.K. & Sondek, J. (2006):** Regulation of phospholipase C isozymes by Ras superfamily GTPases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 46, 335-379.
- 32) **Heneweer, C., Kruse, L.H., Kindhäuser, F., Schmidt, M., Jakobs, K.H., Denker, H.-W. & Thie, M. (2002):** Adhesiveness of human uterine epithelial RL95-2 cells to trophoblast: Rho protein regulation. *Mol. Hum. Reprod.* 8, 1014-1022.
- 33) **Hubbard, S.R. & Till, J.H. (2000):** Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 373-398.
- 34) **Hwang, J.-I., Oh, Y.-S., Shin, K.-J., Kim, H., Ryu, S.H. & Suh, P.-G. (2005):** Molecular cloning and characterization of a novel phospholipase C, PLC- η . *Biochem. J.* 389, 181-186.
- 35) **Ikura, M. (1996):** Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem. Sci.* 21, 14-17.
- 36) **Ilkaeva, O., Kinch, L.N., Paulssen, R.H. & Ross, E.M. (2002):** Mutations in the carboxyl-terminal domain of phospholipase C- β 1 delineate the dimer interface and a potential $\text{G}\alpha_q$ interaction site. *J. Biol. Chem.* 277, 4294-4300.
- 37) **Jang, I.H., Lee, S., Park, J.B., Kim, J.H., Lee, C.S., Hur, E.-M., Kim, I.S., Kim, K.-T., Yagisawa, H., Suh, P.-G. & Ryu, S.H. (2003):** The direct interaction of phospholipase C- γ 1 with phospholipase D2 is important for epidermal growth factor signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 18184-18190.
- 38) **Jin, T.-G., Satoh, T., Liao, Y., Song, C., Gao, X., Kariya, K.-I., Hu, C.-D. & Kataoka, T. (2001):** Role of the CDC25 homology domain of phospholipase C ϵ in amplification of Rap1-dependent signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 30301-30307.
- 39) **Karin, M. (1992):** Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease. *FASEB J.* 6, 2581-2590.

- 40) **Kavran, J.M., Klein, D.E., Lee, A., Falasca, M., Isakoff, S.J., Skolnik, E.Y. & Lemmon, M.A. (1998):** Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by pleckstrin homology domains. *J. Biol. Chem.* 273, 30497-30508.
- 41) **Kazanietz, M.G. (2000):** Eyes wide shut: protein kinase C isozymes are not the only receptors for the phorbol ester tumor promoters. *Mol. Carcinog.* 28, 5-11.
- 42) **Kelley, G.G., Reks, S.E., Ondrako, J.M., Smrcka & A.V. (2001):** Phospholipase C ϵ : a novel Ras effector: *EMBO J.* 20, 743-754.
- 43) **Kelley, G.G., Reks, S.E. & Smrcka, A.V. (2004):** Hormonal regulation of phospholipase C ϵ through distinct and overlapping pathways involving G₁₂ and Ras family G-proteins. *Biochem. J.* 378, 129-139.
- 44) **Kim, H.K., Kim, J.W., Zilberstein, A., Margolis, B., Kim, J.G., Schlessinger, J. & Rhee, S.G. (1991):** PDGF stimulation of inositol phospholipid hydrolysis requires PLC- γ 1 phosphorylation on tyrosine residues 783 and 1254. *Cell* 65, 435-441.
- 45) **Kim, C.G., Park, D. & Rhee, S.G. (1996):** The role of carboxyl-terminal basic amino acids in G α_q -dependent activation, particulate association, and nuclear localization of phospholipase C- β 1. *J. Biol. Chem.* 271, 21187-21192.
- 46) **Kim, Y.-H., Park, T.-J., Lee, Y.H., Baek, K.J., Suh, P.-G., Ryu, S.H., & Kim, K.-T. (1999):** Phospholipase C- δ 1 is activated by capacitative calcium entry that follows phospholipase C- β activation upon bradykinin stimulation. *J. Biol. Chem.* 274, 26127-26134.
- 47) **Kitts, P.A. & Possee, R.D. (1993):** A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *BioTechniques* 14, 810-817.
- 48) **Krauss, G. (2003):** Biochemistry of Signal Transduction and Regulation. 3. Ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
- 49) **Laemmli, U.K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- 50) **Lefkowitz, R.J. (2000):** The superfamily of heptahelical receptors. *Nat. Cell Biol.* 2, E133-E136.
- 51) **Lopez, I., Mak, E.C., Ding, J., Hamm, H.E. & Lomasney, J.W. (2001):** A novel bifunctional phospholipase C that is regulated by G α_{12} and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 2758-2765.
- 52) **Lorenzo, P.S., Kung, J.W., Bottorff, D.A., Garfield, S.H., Stone, J.C. & Blumberg, P.M. (2001):** Phorbol ester modulate the Ras exchange factor RasGRP3. *Cancer Res.* 61, 943-949.
- 53) **Ma, Y.-C., Huang, J., Ali, S., Lowry, W. & Huang, X.-Y. (2000):** Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins. *Cell* 102, 635-646.

- 54) **Madani, S., Hichami, A., Charkaoui-Malki, M. & Khan, N.A. (2004):** Diacylglycerols containing omega 3 and omega 6 fatty acids bind to RasGRP and modulate MAP kinase activation. *J. Biol. Chem.* 279, 1176-1183.
- 55) **Newton, A.C. (2001):** Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev.* 101, 2353-2364.
- 56) **Ohba, Y., Mochizuki, N., Yamashita, S., Chan, A.M., Schrader, J.W., Hattori, S., Nagashima, K., & Matsuda, M. (2000a):** Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J. Biol. Chem.* 275, 20020-20026.
- 57) **Ohba, Y., Mochizuki, N., Matsuo, K., Yamashita, S., Nakaya, M., Hashimoto, Y., Hamaguchi, M., Kurata, T., Nagashima, K., & Matsuda, M. (2000b):** Rap2 as a slowly responding molecular switch in the Rap1 signaling cascade. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6074-6083.
- 58) **Oh-hora, M., Johmura, S., Hashimoto, A., Hikida, M., & Kurosaki, T. (2003):** Requirement for Ras guanine nucleotide releasing protein 3 in coupling phospholipase C- γ 2 to Ras in B cell receptor signaling. *J. Exp. Med.* 198, 1841-1851.
- 59) **Ozaki, N., Miura, Y., Yamada, T., Kato, Y. & Oiso, Y. (2005):** RasGRP3 mediates phorbol ester-induced, protein kinase C-independent exocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 765-771.
- 60) **Parsons, J.T. & Parsons, S.J. (1997):** Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9, 187-192.
- 61) **Peralta, E.G., Ashkenazi, A., Winslow, J.W., Ramachandran, J. & Capon, D.J. (1988):** Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature* 334, 434-437.
- 62) **Quilliam, L.A., Rebhun, J.F., & Castro, A.F. (2002):** A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases. *Prog. Nucl. Acid Res.* 71, 391-444.
- 63) **Rebecchi, M. J. & Pentyala, S. N. (2000):** Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.* 80, 1291-1335.
- 64) **Rebhun, J.F., Castro A.F. & Quilliam, L.A. (2000):** Identification of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) for the Rap1 GTPase. Regulation of MR-GEF by M-Ras-GTP interaction. *J. Biol. Chem.* 275, 34901-34908.
- 65) **Reuther, G.W, Lambert, Q.T., Rebhun, J.F., Caligiuri, M.A. & Quilliam, L.A., Der, C.J. (2002):** RasGRP4 is a novel Ras activator isolated from acute myeloid leukemia. *J. Biol. Chem.* 277, 30508-30514.
- 66) **Rhee, S.G. (2001):** Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 281-312.

- 67) **Roberts, D.M., Anderson, A.L., Hidaka, M., Swetenburg, R.L., Patterson, Stanford, W.L. & Bautch, V.L. (2004):** A vascular gene trap screen defines RasGRP3 as an angiogenesis-regulated gene required for the endothelial response to phorbol esters. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10515-10528.
- 68) **Ross, E.M. & Wilkie, T.M. (2000):** GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 795-827.
- 69) **Sambook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989):** Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, N.Y.
- 70) **Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. (1985):** Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230, 1350-1354.
- 71) **Saunders, C.M., Larman, M.G., Parrington, J., Cox, L.J., Royse, J., Blayney, L.M., Swann, K. & Lai, F.A. (2002):** PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129, 3533-3544.
- 72) **Schlessinger, J. (2000):** Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.
- 73) **Sellner, L.N., Coelen, R.J. & MacKenzie, J.S. (1992):** Reverse Transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucl. Acids Res.* 20, 1487-1490.
- 74) **Schmidt, M., Hüwe, S.M., Fasselt, B., Homann, D., Rümenapp, U., Sandmann, J. & Jakobs, K.H. (1994):** Mechanisms of phospholipase D stimulation by m3 muscarinic acetylcholine receptors. Evidence for involvement of tyrosine phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 225, 667-675.
- 75) **Schmidt, M., Frings, M., Mono, M.-L., Guo, Y., Weernink, P.A., Evellin, S., Han, L. & Jakobs, K.H. (2000):** G protein-coupled receptor-induced sensitization of phospholipase C stimulation by receptor tyrosine Kinases. *J. Biol. Chem.* 275, 32603-32610.
- 76) **Schmidt, M., Evellin, S., Oude Weernink, P.A., vom Dorp, F., Rehmann, H., Lomasney, J.W. & Jakobs, K.H. (2001):** A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nat. Cell Biol.* 3, 1020-1024.
- 77) **Schmidt, M., Oude Weernink, P.A., vom Dorp, F., Stope, M.B. & Jakobs, K.H. (2004):** Mammalian Phospholipase C. In: van der Vusse, G.J. (Ed): Lipobiology; Advances in Molecular and Cellular Biology. Vol. 33; S. 433-553, Amsterdam: Elsevier Science.
- 78) **Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. (1985):** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.

- 79) **Snyder, J.T., Singer, A.U., Wing, M.R., Harden, T.K. & Sondek, J. (2003):** The pleckstrin homology domain of phospholipase C- β_2 as an effector site for Rac. *J. Biol. Chem.* 278, 21099-21104.
- 80) **Song, C., Hu, C.D., Masago, M., Kariya, K.-I., Yamawaki-Kataoka, Y., Shibatohe, M., Wu, D., Satoh, T. & Kataoka, T. (2001):** Regulation of a novel human phospholipase C, PLC ϵ , through membrane targeting by Ras. *J. Biol. Chem.* 276, 2752-2757.
- 81) **Song, C., Satoh, T., Edamatsu, H., Wu, D., Tadano, M., Gao, X. & Kataoka, T. (2002):** Differential roles of Ras and Rap1 in growth factor-dependent activation of phospholipase C ϵ . *Oncogene* 21, 8105-8113.
- 82) **Springett, G.M, Kawasaki, H. & Spriggs, D.R. (2004):** Non-kinase second-messenger signaling: new pathways with new promise. *BioEssays* 26, 730-738.
- 83) **Srinivasan, G., Post, F.J. & Thompson, E.B. (1997):** Optimal ligand binding by the recombinant human glucocorticoid receptor and assembly of the receptor complex with heat shock protein 90 correlate with high intracellular ATP levels in *Spodoptera frugiperda* cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 60, 1-9.
- 84) **Stope, M.B., Karger, A., Schmidt, U. & Buchholz, U.J. (2001):** Chimeric bovine respiratory syncytial virus with attachment and fusion glycoproteins replaced by bovine parainfluenza virus type 3 hemagglutinin-neuraminidase and fusion proteins. *J. Virol.* 75, 9367-9377.
- 85) **Stope, M.B., vom Dorp, F., Szatkowski, D., Böhm, A., Keiper, M., Nolte, J., Oude Weernink, P.A., Roskopf, D., Evellin, S., Jakobs, K.H. & Schmidt, M. (2004):** Rap2B-dependent stimulation of phospholipase C- ϵ by the epidermal growth factor receptor mediated by c-Src phosphorylation of RasGRP3. *Mol. Cell Biol.* 24, 4664-4676.
- 86) **Suh, P.-G., Hwang, J.-I., Ryu, S.H., Donowitz, M. & Kim, J.H. (2001):** The roles of PDZ-containing proteins in PLC- β -mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19, 1-7.
- 87) **Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T. (2001):** Small GTP-binding proteins. *Physiol. Rev.* 81, 153-208.
- 88) **Taniguchi, T. (1995):** Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268, 251-255.
- 89) **Teixeira, C., Stang, S.L., Zheng, Y., Beswick, N.S. & Stone, J.C. (2003):** Integration of DAG signaling systems mediated by PKC-dependent phosphorylation of RasGRP3. *Blood* 102, 1414-1420.
- 90) **Tognon, C.E., Kirk, H.E., Passmore, L.A., Whitehead, I.P., Der, C.J. & Kay, R.J. (1998):** Regulation of RasGRP via a phorbol ester-responsive C1 domain. *Mol. Cell Biol.* 18, 6995-7008.
- 91) **Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979):** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.

- 92) **Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1978):** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 615-619.
- 93) **Voß, M., Oude Weernink, P.A., Haupenthal, S., Möller, U., Cool, R.H., Bauer, B., Camonis, J.H., Jakobs, K.H. & Schmidt, M. (1999):** Phospholipase D stimulation by receptor tyrosine kinases mediated by protein kinase C and a Ras/Ral signaling cascade. *J. Biol. Chem.* 274, 34691-34698.
- 94) **Wang, T., Pentyala, S., Rebecchi, M.J. & Scarlata, S. (1999):** Differential association of the pleckstrin homology domains of phospholipases C- β_1 , C- β_2 and C- δ_1 with lipid bilayers and the $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G Proteins. *Biochemistry* 38, 1517-1524.
- 95) **Wing, M.R., Houston, D., Kelley, G.G., Channing, J.D., Siderovski, D.P. & Harden, T.K. (2001):** Activation of phospholipase C- ε by heterotrimeric G protein $\beta\gamma$ -subunits. *J. Biol. Chem.* 276, 48257-48261.
- 96) **Wing, M.R., Snyder, J.T., Sondek, J. & Harden, T.K. (2003):** Direct activation of phospholipase C- ε by Rho. *J. Biol. Chem.* 278, 41253-41258.
- 97) **Yamashita, S., Mochizuki, N., Ohba, Y., Tobiume, M., Okada, Y., Sawa, H., Nagashima, K. & Matsuda, M. (2000):** CalDAG-GEFIII activation of Ras, R-Ras, and Rap1. *J. Biol. Chem.* 275, 25488-25493.
- 98) **Yang, Y., Li, L., Wong, G.W., Krilis, S.A., Madhusudhan, M.S., Sali, A. & Stevens, R.L. (2002):** RasGRP4, a new mast cell-restricted Ras guanine nucleotide-releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *J. Biol. Chem.* 277, 25756-25774.
- 99) **Ye, K., Aghdasi, B., Luo, H.R., Moriarity, J.L., Wu, F.Y., Hong, J.J., Hurt, K.J., Bae, S.S., Suh, P.-G. & Snyder, S.H. (2002):** Phospholipase C γ 1 is a physiological guanine nucleotide exchange factor for the nuclear GTPase PIKE. *Nature* 415, 541-544.
- 100) **Zheng, Y., Liu, H., Coughlin, J., Zheng, J., Li, L. & Stone, J.C. (2005):** Phosphorylation of RasGRP3 on threonine 133 provides a mechanistic link between PKC and Ras signaling systems in B cells. *Blood* 105, 3648-3654.

7. Anhang

7.1 Verwendete Abkürzungen

AC	Adenylylcyclase
ALK	Anaplastische Leukämie-Kinase
AM	Acetoxymethylester
AML	Akute Myeloische Leukämie
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AT	Annealing-Temperatur
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetylsäure
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure
BCR	B-Zellrezeptor
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C3G	<i>Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide exchange factor</i>
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration
CalDAG-GEF	<i>Calcium and Diacylglycerol regulated Guanine nucleotide Exchange Factor</i>
cAMP	zyklisches AMP
CDC25-Domäne	<i>cell division cycle 25 protein</i> -Domäne
cDNA	<i>cyclic desoxyribonucleic acid</i>
CHO-Zellen	<i>chinese hamster ovary</i> -Zellen
Ci	Curie (1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Bequerel)
Cl.	<i>Clostridium</i>
COS-7-Zellen	<i>Cercopithecus aethiops</i> -7-Zellen
c-Src (-Kinase)	zelluläre Src-Kinase
Csk	c-Src-spezifische Kinase
DAG	Diacylglycerol
Da	Dalton
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat

DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Elongationsfaktor
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglykolbis(2-Aminomethylether)-N,N,N',N'tetraacetylsäure
Epac	<i>exchange protein activated by cAMP</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated-Kinase</i>
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GDP	Guanosinbiphosphat
GDS	<i>Guanine nucleotide dissociation stimulator</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GH	<i>growth hormone</i>
GNRP	<i>Guanine nucleotide releasing protein</i>
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HA	<i>influenza hemagglutinin epitope tag</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HeBS	<i>HEPES-buffered solution</i>
HEK-293-Zellen	<i>human embryonic kidney-293-Zellen</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HMW	<i>high molecular weight</i>
H-Ras	<i>Harvey-Ras</i>
IgG	Immunglobulin G

IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JNK	c-Jun-NH ₂ -terminale Kinasen
K-Ras	<i>Kirsten-Ras</i>
LB	<i>Lennox L Broth Base (Lennox Base)</i>
LMW	<i>low molecular weight</i>
mAChR oder M _x -R	muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor
MAP-Kinase	<i>mitogen activated protein-Kinase</i>
MCS	multiple Klonierungsstelle
MEKK	MAP/ERK-Kinase
MG	Molekulargewicht
(m/v)	Masse pro Volumen
nPKC	<i>novel PKC</i>
N-Ras	<i>neuroblastoma-Ras</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Dulbecco`s phosphate-buffered saline</i>
PC12-Zellen	<i>pheochromocytoma</i> 12-Zellen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDZ	<i>PSD-95-Discs-large/ZO-1 domain</i>
PEG	Polyethylenglykol
pfu	<i>plaque forming unit</i>
PH	<i>pleckstrin homology domain</i>
PIKE	<i>phosphatidylinositol-3-OH kinase enhancer</i>
PI(3)K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PI(3)P ₂	Phosphatidylinositol-3-Bisphosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-1,4,5-Bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-Myristo-13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

P-Tyr	Phosphotyrosin
RA domain	<i>Ras/Rap-associating domain oder Ral-GDS/AFG-homology domain</i>
RalGDS-RBD	<i>Ral guanine nucleotide dissociation stimulator- Rap-binding domain</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RasGRP	<i>Ras Guanine nucleotide Releasing Protein</i>
Rat2-Zellen	<i>Rattus Norvegicus</i> 2-Zellen
REM	<i>Ras exchange(r) motif</i>
Repac-Protein	<i>related to Epac-Protein</i>
RGS	<i>Regulator of G Protein Signaling</i>
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
Sf9-Zellen	<i>Spodoptera frugiperda</i> -Zellen
SH	<i>Src homology domain</i>
SOC-Medium	SOB-Medium mit Glukose und Magnesium
Src (-Kinase)	<i>Rous Sarcoma Virus</i> -Kinase
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNM-FH	<i>Trichoplusiani nutrient medium-formulation hink</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
V	Vektor
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
v-Ras	virales Ras
v-Src (-Kinase)	virale Src-Kinase
(v/v)	Volumen pro Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Die Erarbeitung und Verfassung dieser Dissertation wäre ohne die kompetente und geduldige Unterstützung einer Vielzahl von Menschen meines beruflichen und privaten Umfeldes nicht möglich gewesen. Diesen Personen möchte ich an dieser Stelle meinen Dank zum Ausdruck bringen.

An erster Stelle gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. Karl H. Jakobs, Direktor des Instituts für Pharmakologie des Universitätsklinikums Essen, der mir dieses interessante Thema überlassen hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Martina Schmidt für ihre engagierte Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit und ihre zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge.

Für die fachmännische Hilfe bei der Durchführung der Versuche danke ich vor allem Herrn Dr. Matthias Stope, der mir bei Fragen stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie, insbesondere Frau Kirsten Baden, Frau Helgard Geldermann, Frau Monika Hagedorn, Frau Annette Kötting-Dorsch, Frau Doris Petermeyer und Frau Dr. Melanie Leuchter, die auf unterschiedlichste Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und die mir jederzeit mit Hilfestellungen zur Verfügung standen.

Der Internen Forschungsförderung der Universität Duisburg-Essen möchte ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des IFORES-Stipendiums danken.

Bei meiner Freundin Sandra Christoph bedanke ich mich für die liebevolle Motivation während der gesamten Arbeit, für ihre Geduld und ihren Zuspruch, der bei Rückschlägen bei der Laborarbeit hin und wieder notwendig war.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Adalbert und Maria Szatkowski, ohne deren immer währende Unterstützung es mir nicht möglich gewesen wäre, Medizin zu studieren und die vorliegende Doktorarbeit anzufertigen.

Persönliche Daten

- Name: Daniel Christian Szatkowski
- Geburtsdatum: 15. Dezember 1978
- Geburtsort: Bochum-Wattenscheid
- Wohnort: Bochum-Wattenscheid
- Familienstand: ledig
- Nationalität: deutsch

Schulischer Werdegang

08.1985 – 06.1989	Gemeinschaftsgrundschule Wattenscheid-West in Bochum
08.1989 – 06.1998	Gymnasium Märkische Schule in Bochum
27. Mai 1998	Abitur am Gymnasium Märkische Schule in Bochum

Bundeswehr / Zivildienst

06. 1998 – 09. 1998	Jugendherberge Essen-Werden
09. 1998 – 06. 1999	Marienhospital Gelsenkirchen

Medizinstudium

09. 1999 – 09. 2001	vorklinischer Studienabschnitt an der Ruhr-Universität Bochum
09. 2001 – 09. 2002	1. klinischer Studienabschnitt an der Ruhr-Universität Bochum
10. 2002 – 03. 2005	2. klinischer Studienabschnitt an der Universität Duisburg-Essen
04. 2005 – 08. 2005	Chirurgie-Tertial des PJ am Prosper-Hospital Recklinghausen
08. 2005 – 11. 2005	Innere Medizin-Tertial des PJ am Kantonsspital St. Gallen, CH
11. 2005 – 03. 2006	Anästhesie-Tertial des PJ am Prosper-Hospital Recklinghausen
4. September 2001	Ärztliche Vorprüfung
25. März 2003	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
22. März 2005	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
24. April 2006	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2. Mai 2006	Staatsexamen Humanmedizin

Promotion

09. 2002 – 02. 2003	Experimentelle Doktorarbeit, Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen
---------------------	--

Auszeichnungen

- Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
- 1. Platz des Fakultätspreises für Studierende 2002 der Medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum